



Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας



**Διερεύνηση του ρόλου του γονιδίου
AtHesp του *Arabidopsis thaliana* στη
φωτοσύνθεση και την οξειδωτική
καταπόνηση**

Ιουλιέττα Μουστάκα

Διπλωματική εργασία
Λάρισα 2013



University of Thessaly

Department of Biochemistry and Biotechnology



Role of *AtHesp* gene of *Arabidopsis thaliana* in photosynthesis and oxidative stress

Julietta Moustaka

Diploma thesis

Larissa 2013

Υπεύθυνη Καθηγήτρια:

Παπαδοπούλου Καλλιόπη Αναπληρώτρια Καθηγήτρια

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας,

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Τριμελής Επιτροπή:

Παπαδοπούλου Καλλιόπη Αναπληρώτρια Καθηγήτρια

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας,

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Μπαλατσός Νικόλαος,

Επίκουρος Καθηγητής

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας,

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Τσίκου Δανιέλα

Λέκτορας επί συμβάσει (ΠΔ 407/80)

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας,

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ευχαριστίες:

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς επιτροπής και ιδιαίτερα την καθηγήτριά μου, κυρία Παπαδοπούλου Καλλιόπη, για την υπόδειξη του θέματος, την εμπιστοσύνη και την καθοδήγησή της. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Κροκιδά Αφροδίτη για τη βοήθειά της. Τέλος, ευχαριστώ όλους τους προπτυχιακούς και μεταπτυχιακούς φοιτητές του εργαστηρίου βιοτεχνολογίας φυτών και περιβάλλοντος για τη συνεργασία.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη	1
Summary	2
Εισαγωγή	3
I. Το φυτό <i>Arabidopsis thaliana</i>	3
II. Η αποικοδόμηση του mRNA και οι αποαδενυλάσεις	4
III. Το γονίδιο <i>AtHesp</i> του <i>Arabidopsis thaliana</i>	6
IV. Φωτοσύνθεση	7
V. Μηχανισμός της φωτοσύνθεσης	8
VI. Φθορισμός της χλωροφύλλης	9
VII. Φωτεινές αντιδράσεις	12
VIII. Κατανομή της ενέργειας αποδιέγερσης	13
IX. Το αβιοτικό στρες	14
X. Το οξειδωτικό στρες	16
XI. Τα φυτοφάρμακα	17
XII. Το ζιζανιοκτόνο παρακουάτ (paraquat, Pq)	18
XIII. Σκοπός της εργασίας	19
Υλικά και Μέθοδοι	20
I. Φυτικό υλικό	20
II. Συνθήκες ανάπτυξης	20
II. Επίδραση παρακουάτ (paraquat, Pq)	21
IV. Μελέτη της φωτοσυνθετικής απόδοσης με τη μέθοδο της απεικόνισης του φθορισμού της χλωροφύλλης	21
V. Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων	25
Αποτελέσματα	26
I. Επίδραση του Pq στον οικότυπο Col-0 του <i>Arabidopsis thaliana</i>	26
I 1. Επίδραση του Pq στην κατανομή ενέργειας του PSII	26
I 2. Επίδραση του Pq στη μη φωτοχημική απόσβεση (NPQ)	32
I 3. Επίδραση του Pq στο ρυθμό μεταφοράς ηλεκτρονίων (ETR) του PSII	33

I 4. Επίδραση του Pq στην πίεση αποδιέγερσης ($1-q_p$) του PSII	34
II. Επίδραση του Pq στο μετάλλαγμα <i>AtHesp</i> του <i>Arabidopsis thaliana</i>	35
II 1. Επίδραση του Pq στην κατανομή ενέργειας του PSII	35
II 2. Επίδραση του Pq στη μη φωτοχημική απόσβεση (NPQ)	40
II 3. Επίδραση του Pq στο ρυθμό μεταφοράς ηλεκτρονίων (ETR) του PSII	41
II 4. Επίδραση του Pq στην πίεση αποδιέγερσης ($1-q_p$) του PSII	42
III. Σύγκριση των επιπτώσεων του Pq στον οικότυπο Col-0 και στο μετάλλαγμα <i>AtHesp</i>	44
III 1. Σύγκριση της επίδρασης του Pq στη μέγιστη απόδοση φωτονίων (F_v/F_m) του PSII	44
III. 2. Σύγκριση της επίδρασης του Pq στην κατανομή ενέργειας του PSII	45
III. 3. Σύγκριση της επίδρασης του Pq στη μη φωτοχημική απόσβεση (NPQ)	49
III. 4. Σύγκριση της επίδρασης του Pq στο ρυθμό μεταφοράς ηλεκτρονίων (ETR) του PSII	50
III. 5. Σύγκριση της επίδρασης του Pq στη φωτοχημική απόσβεση (q_p)	51
III. 6. Σύγκριση της επίδρασης του Pq στην πίεση αποδιέγερσης του PSII	52
Συζήτηση	54
I. Η φωτοχημική απόδοση του οικότυπου Col-0 και του μεταλλάγματος <i>AtHesp</i> του <i>Arabidopsis thaliana</i> σε φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης	54
II. Η φωτοχημική απόδοση του οικότυπου Col-0 και του μεταλλάγματος <i>AtHesp</i> του <i>Arabidopsis thaliana</i> υπό την επίδραση του Pq	55
III. Χωρο-χρονική μεταβολή της φωτοχημικής απόδοσης του οικότυπου Col-0 και του μεταλλάγματος <i>AtHesp</i> του <i>Arabidopsis thaliana</i> υπό την επίδραση του Pq	60
Βιβλιογραφία	63

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση του γονιδίου *AtHesp* του *Arabidopsis thaliana* στη λειτουργία του φωτοσυστήματος II σε φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης και σε συνθήκες οξειδωτικού stress, χρησιμοποιώντας φυτά ηλικίας 4 εβδομάδων Col-0 και μεταλλάγματα knock down *AtHesp*. Με τη χρήση της μεθόδου της απεικόνισης του φθορισμού της χλωροφύλλης διαπιστώθηκε ότι σε φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης η απόδοση φωτονίων του φωτοσυστήματος II (ΦPSII) του *AtHesp* ήταν μεγαλύτερη με ταυτόχρονη σημαντική μείωση της αποβολής ενέργειας διέγερσης υπό τη μορφή θερμότητας (ΦNPQ) η οποία συνοδεύτηκε επίσης από μειωμένη μη ελεγχόμενη αποβολή της ενέργειας διέγερσης (ΦNO), συγκριτικά με τον οικότυπο Col-0. Επομένως σε φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης η κατανομή της ενέργειας του PSII ήταν καλύτερη στο μετάλλαγμα *AtHesp* με αποτέλεσμα να έχει μικρότερη πίεση αποδιέγερσης ($1-q_P$). Σε συνθήκες οξειδωτικού στρες που δημιουργήθηκε με τον ψεκασμό των φύλλων με 1mM παρακουάτ (Pq), τόσο το Col-0 όσο και το *AtHesp*, 20 λεπτά μετά τον ψεκασμό με Pq για την αποφυγή δημιουργίας ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS) μείωσαν το Φ PSII αυξάνοντας το Φ NPQ και με ταυτόχρονη μείωση του Φ NO. Ωστόσο το μετάλλαγμα διατήρησε μεγαλύτερο ρυθμό μεταφοράς ηλεκτρονίων (ETR), έχοντας σημαντικά μικρότερη μη φωτοχημική απόσβεση (NPQ) και ταυτόχρονα μεγαλύτερο αριθμό ανοιχτών κέντρων αντίδρασης (q_P) συγκριτικά με το Col-0. Δηλαδή στο μετάλλαγμα δε χρειάστηκε η ενεργοποίηση του φωτοπροστατευτικού μηχανισμού του NPQ για την προστασία του έναντι των ROS όσο στο Col-0 γιατί πιθανόν διαθέτε αυξημένο αντιοξειδωτικό ενζυμικό μηχανισμό. Επιπλέον, η επαγωγή του φωτοπροστατευτικού μηχανισμού του “κύκλου του νερού” στο Col-0 φαίνεται ότι δεν ήταν αρκετά επαρκής για την προστασία του από το οξειδωτικό στρες καθώς παρουσίασε σημαντικά μειωμένο ποσοστό ανοιχτών κέντρων αντίδρασης συγκριτικά με τα φυτά μάρτυρες. Μία ώρα μετά την επίδραση του Pq, το μετάλλαγμα παρουσίασε σημαντικά αυξημένο Φ PSII έχοντας όμως σημαντικά μειωμένο Φ NPQ και αυξημένο ΦNO, συγκριτικά με το Col-0. Επίσης το *AtHesp* διατήρησε σημαντικά αυξημένο ETR και σημαντικά μειωμένο NPQ, χωρίς όμως να διατηρήσει σημαντικά μεγαλύτερο ποσοστό ανοιχτών κέντρων αντίδρασης συγκριτικά με το Col-0. Επιπλέον, τόσο το Col-0 όσο και το *AtHesp*, παρουσίασαν σημαντικά μειωμένο ποσοστό ανοιχτών κέντρων αντίδρασης συγκριτικά με τα φυτά μάρτυρες, δηλαδή μία ώρα μετά την επίδραση του Pq οι φωτοπροστατευτικοί μηχανισμοί φαίνεται ότι δεν ήταν αρκετά επαρκείς για την προστασία τους από το οξειδωτικό στρες. Τέσσερις ώρες μετά την επίδραση του Pq τα φυτά Col-0 φαίνεται ότι αρχίζουν να ανακάμπτουν από το οξειδωτικό στρες πολύ καλύτερα απ’ ότι τα μεταλλάγματα *AtHesp*.

SUMMARY

We investigated the effect of *Arabidopsis thaliana* *AtHesp* gene in photosystem II (PSII) functioning under physiological growth conditions and under oxidative stress, using 4 weeks old plants Col-0 and knock down *AtHesp* mutants. By using the method of chlorophyll fluorescence imaging we found that under physiological growth conditions the quantum yield of photochemical energy conversion in PSII (Φ_{PSII}) was higher in *AtHesp* with a simultaneously significant decrease in the yield of regulated non-photochemical energy loss in PSII (Φ_{NPQ}), which was accompanied by a decreased quantum yield of non-regulated energy loss in PSII (Φ_{NO}), compared to Col-0. Thus, under physiological growth conditions the allocation of absorbed light energy in PSII was better in the mutant, resulting in lower excitation pressure ($1-q_P$). Under oxidative stress conditions simulated by 1mM paraquat (Pq) spray, Col-0 plants as well as *AtHesp*, 20 minutes after Pq spray, they decreased Φ_{PSII} increasing at the same time Φ_{NPQ} and decreasing Φ_{NO} also, in order to avoid the creation of reactive oxygen species (ROS). However, the mutant maintained higher electron transport rate (ETR) with a significant lower non-photochemical quenching (NPQ), that reflects heat dissipation of excitation energy, while maintaining simultaneously a higher fraction of open reaction centers (q_P), compared to Col-0. In other words, the mutant didn't need to activate the photoprotective mechanism of NPQ in order to be protected from ROS as much as Col-0 did, possibly because it possessed a higher antioxidant enzymatic system. Moreover, the induction of the photoprotective mechanism of "water-water cycle" in Col-0 was not sufficient enough to protect it from oxidative stress, as it maintain a lower fraction of open reaction centers compared to control plants. One hour after Pq spray, the mutant showed significant increased Φ_{PSII} , while Φ_{NPQ} decreased significant and Φ_{NO} increased, compared to Col-0. In addition, *AtHesp* maintained significant increased ETR and significant decreased NPQ but without maintaining a significant higher fraction of open reaction centers compared to Col-0. Furthermore, both Col-0 and *AtHesp*, presented significant decreased fraction of open reaction centers compared to their controls, so it seems that one hour after Pq spray the photoprotective mechanisms were not sufficient enough to protect the plants from oxidative stress. Four hours after Pq spray, Col-0 plants seem to begin to recover from the oxidative stress much better than *AtHesp* mutants.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

I. Το φυτό *Arabidopsis thaliana*

Το *Arabidopsis thaliana* (**Εικόνα 1**) είναι ένα μικρό αγγειόσπερμο δικοτυλήδονο φυτό της οικογένειας των σταυρανθών. Είναι μονοετές και αυτοφυές σε Ευρώπη, Ασία, Βορειοδυτική Αφρική, Βόρεια και Νότια Αμερική (Al-Shehbaz and O'Kane 2002, Σπερδούλη 2011). Το ύψος του κυμαίνεται μεταξύ 2 με 25 cm και τα φύλλα του σχηματίζουν ροζέτες στη βάση του. Το *Arabidopsis thaliana* διαθέτει χαρακτηριστικά που συνετέλεσαν, ώστε να χαρακτηριστεί ως μοντέλο-οργανισμός, ιδανικό για μελέτη της γενετικής, κυτταρικής και μοριακής βιολογίας των ανθοφύτων (Meinke et al. 1998, Σπερδούλη 2011). Μέχρι στιγμής έχουν περιγραφεί πολλές μεταλλάξεις στο



Εικόνα 1. Το φυτό *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis thaliana που επηρεάζουν ένα ευρύ φάσμα αναπτυξιακών διεργασιών και μεταβολικών μονοπατιών (Meyerowitz 1989), ενώ έχει

ολοκληρωθεί και ο γενετικός χάρτης σύνδεσης, ο οποίος περιέχει 86 μορφολογικούς δείκτες (Koorneef 1990, Διαμαντοπούλου 2012).

II. Η αποικοδόμηση του mRNA και οι αποαδενυλάσεις

Τα ευκαρυωτικά mRNA ωριμάζουν με την προσθήκη δύο χαρακτηριστικών: της poly(A) ουράς στο 3' άκρο του και της καλύπτρας στο 5' άκρο του. Τα δύο αυτά χαρακτηριστικά προσδίδουν σταθερότητα στη δομή του mRNA. Στο 5' άκρο προστίθεται μία μεθυλιωμένη γουανίνη με τριφωσφορικό δεσμό 5'-5' ενώ στο 3' άκρο προστίθεται η πολύ(A) ουρά. Η αποικοδόμηση του λοιπόν ξεκινάει όταν ένας από αυτούς τους παράγοντες αποδεσμευτεί ή κοπεί ενδονουκλεοτιδικά το mRNA (Αναστασάκης 2011). Η αποικοδόμηση του ευκαρυωτικού mRNA παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης και ξεκινάει από την βράχυνση της πολυ (A) ουράς στο 3' άκρο του μια διαδικασία που είναι γνωστή ως αποαδενυλίωση και πραγματοποιείται από τις αποαδενυλάσεις (Τομασίδου 2010). Ως αποαδενυλάσεις ορίζουμε τις εξωριβονουκλεάσες που αποικοδομούν την poly(A) ουρά των mRNAs με κατεύθυνση 3'→5' απελευθερώνοντας 5'-AMP (Tucker et al. 2000, Τομασίδου 2010). Έχει βρεθεί ότι οι αποαδενυλάσεις προτιμούν 3'- poly(A) ως υπόστρωμα, παρά το γεγονός πως σε ορισμένες περιπτώσεις έχει δείχτεί ότι αποικοδομούν λιγότερο αποτελεσματικά και μη-αδενοσινικά ομοπολυμερή (Goldstrohm and Wickens 2008).

Στον πυρήνα με την διαδικασία της αποαδενυλίωσης περιορίζονται οι νεοπροστιθέμενες poly(A) ουρές, στο κατάλληλο μήκος. Τα mRNA για να μπορέσουν να εξέλθουν από τον πυρήνα πρέπει να διαθέτουν poly(A) ουρά

σε κατάλληλο μήκος. Στο κυτταρόπλασμα η εκτεταμένη αποαδενυλίωση του mRNA πέρα από ένα συγκεκριμένο μήκος σηματοδοτεί την αποικοδόμησή του.

Η ρύθμιση της δραστηριότητας των αποαδενυλασών κρίνεται απαραίτητη, καθώς συνθήκες ανεξέλεγκτης αποαδενυλίωσης θα οδηγούσαν σε κατ'αστροφή και θάνατο του κυττάρου έτσι τα σταθερά και μεταγραφικά ενεργά mRNAs πρέπει να προστατευθούν από την αποαδενυλίωση ενώ τα ασταθή και μη φυσιολογικά θα πρέπει να αποαδενυλιώνονται και να οδηγούνται στην αποικοδόμηση (Τομασίδου 2010).

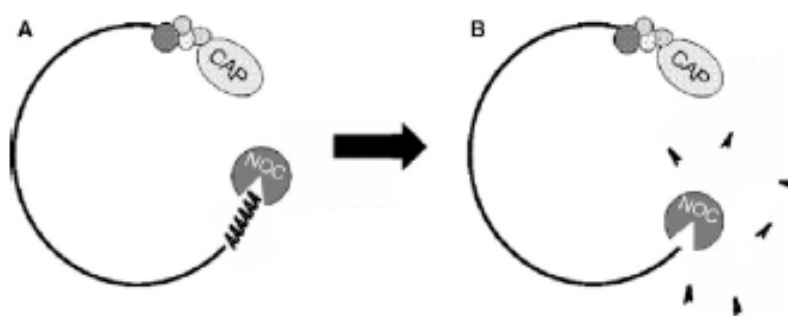
Όλες οι γνωστές αποαδενυλάσες είναι Mg^{2+} -εξαρτώμενα ένζυμα που μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο μεγάλες υπερ-οικογένειες με βάση την παρουσία συγκεκριμένων συντηρημένων καταλοίπων στο καταλυτικό τους κέντρο (Τομασίδου 2010). Όλες οι αποαδενυλάσες ανήκουν σε μια από τις δύο γνωστές ομάδες. Η πρώτη είναι η υπερ-οικογένεια DEDD και η δεύτερη η υπερ-οικογένεια EEP (exonuclease-endonuclease-phosphatase). Οι DEDD αποαδενυλάσες ονομάστηκαν έτσι λόγω των συντηρημένων καταλυτικών αμινοξικών καταλοίπων Asp και Glu τα οποία βρίσκονται σε τρία μοτίβα εξωνουκλεάσης τα οποία δε σμεύουν ιόντα μαγνησίου (Αναστασάκης 2011, Zuo et al. 2001). Μέλη αυτής της ομάδας αποτελούν η αποαδενυλάση POP2 (γνωστή και ως CAF1), η CAF1Z, η πολυ(A)-εξειδικευμένη ριβονουκλεάση (PARN), καθώς και οι οικογένειες των PAN2 αποαδενυλασών. Η AtPARN είναι μια αποαδενυλάση απαραίτητη κατά την πρώιμη φάση της ανάπτυξης του *Arabidopsis thaliana*. Από την άλλη μεριά η υπερ-οικογένεια EEP, περιλαμβάνει αποαδενυλάσες που φέρουν συντηρημένα καταλυτικά κατάλοιπα Asp και His στις δομικές περιοχές νουκλεάσης τους.

Παραδείγματα ΕΕΡ ενζύμων αποτελούν οι αποαδενυλάσες hesperin, CCR4 και Angel (Τοματσίδου 2010).

III. Το γονίδιο AtHesp του *Arabidopsis thaliana*

Το γονίδιο AtHesp του *Arabidopsis thaliana* εκφράζει μια πρωτεΐνη γνωστή ως εσπερίνη. Η εσπερίνη είναι μια 3'-εξωριβονουκλεάση με δράση αποαδενυλάσης, δηλαδή έχει την ικανότητα να αφαιρεί την poly(A)-ουρά από τα mRNAs (**Εικόνα 2**) (Τοματσίδου 2010). Η AtHesp πολυαδενυλάση είναι η δεύτερη πολυαδενυλάση που έχει ανακαλυφτεί στο *Arabidopsis thaliana* μετά την AtPARN και είναι η πρώτη κιρκάδια -ελεγχόμενη αποαδενυλάση του *Arabidopsis thaliana*. Πρόκειται για ένα αλλοστερικό ένζυμο που ανήκει στις νουκλεάσες που εξαρτώνται από μαγνήσιο (Τοματσίδου 2010).

Ο ρόλος της εσπερίνης στην αποαδενυλίωση δεν έχει γίνει γνωστός, αλλά υπάρχουν αποδείξεις ότι ελέγχεται από τον κιρκάδιο ρυθμό και δρα στο επίπεδο της αποικοδόμησης του mRNA και της μετάφρασης (Douris and

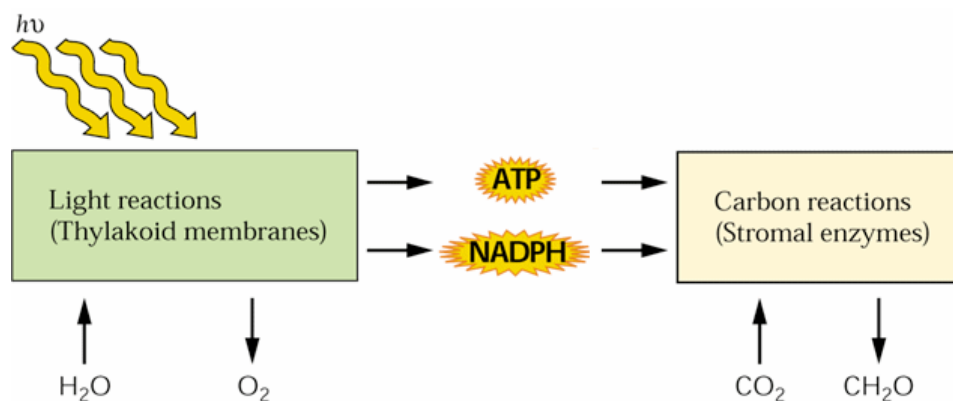


Εικόνα 2. Μετά-μεταγραφική αποαδενυλίωση mRNA από την εξωριβονουκλεάση εσπερίνη. A. Η εσπερίνη προσδένεται στην πολυ(A)-ουρά και ξεκινά την αποικοδόμηση. B. Η μείωση του μήκους πολυαδενυλίωσης μπορεί να οδηγήσει σε εναλλακτική μετάφραση και/ή σε πλήρη αποικοδόμηση του μεταγράψου (Douris and Green 2008, Τοματσίδου 2010).

Green 2008, Τοματσίδου 2010). Αυτό που έχει γίνει γνωστό είναι πως η έκφραση του παρουσιάζει μέγιστο λίγο πριν το σκοτάδι, γεγονός που αποτελεί ένδειξη ότι η *AtHesr* μπορεί να στοχεύει και να αποικοδομεί επιλεγμένα μετάγραφα (Τοματσίδου 2010).

IV. Φωτοσύνθεση

Η φωτοσύνθεση είναι η μοναδική διεργασία βιολογικής σημασίας που μπορεί να δεσμεύσει και να αποθηκεύσει την ενέργεια αυτή (Jung and Niyogi 2008, Διαμαντοπούλου 2012). Η φωτοσύνθεση είναι μια φυσικοχημική διεργασία χάρη στην οποία τα φυτά μπορούν να δεσμεύουν την ηλιακή ενέργεια για να συνθέσουν οργανικές ενώσεις. Η φωτοσύνθεση ως διαδικασία μπορεί να χωριστεί σε δύο στάδια: α) το στάδιο στο οποίο απορροφάται η ηλιακή ενέργεια και μεταφέρεται στα κέντρα αντίδρασης και β) στο στάδιο αναγωγής του CO_2 . Στο πρώτο στάδιο πραγματοποιούνται οι αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίων. Ο τελικός αποδέκτης ηλεκτρονίων είναι το NADP^+ το οποίο με το ηλεκτρόνιο αυτό ανάγεται σε NADPH_2 (Milthorpe and Dale 1983). Στο δεύτερο στάδιο χρησιμοποιούνται τα μόρια αυτά ως πηγή ενέργειας για τη σύνθεση υδατανθράκων. Όπως φαίνεται και στην **εικόνα 3** στο πρώτο στάδιο που πραγματοποιείται στις μεμβράνες των θυλακοειδών λαμβάνουν χώρα οι φωτεινές αντιδράσεις και στη συνέχεια στο δεύτερο στάδιο πραγματοποιούνται οι αντιδράσεις της ενσωμάτωσης του άνθρακα οι οποίες λαμβάνουν χώρα στο στρώμα των χλωροπλαστών.



Εικόνα 3. Οι φωτεινές αντιδράσεις και οι αντιδράσεις του άνθρακα πραγματοποιούνται σε διαφορετικά τμήματα των χλωροπλαστών. Η ηλιακή ενέργεια απαιτείται για τη σύνθεση ATP και NADPH που πραγματοποιούνται μέσω μιας σειράς αντιδράσεων στις θυλακοειδείς μεμβράνες των χλωροπλαστών. Αυτά τα προϊόντα των φωτεινών αντιδράσεων χρησιμοποιούνται στη συνέχεια από μια σειρά ενζύμων του στρώματος, τα οποία ενσωματώνουν το CO₂ σε υδατάνθρακες μέσω των αντιδράσεων του άνθρακα (Malkin and Niyogi 2000).

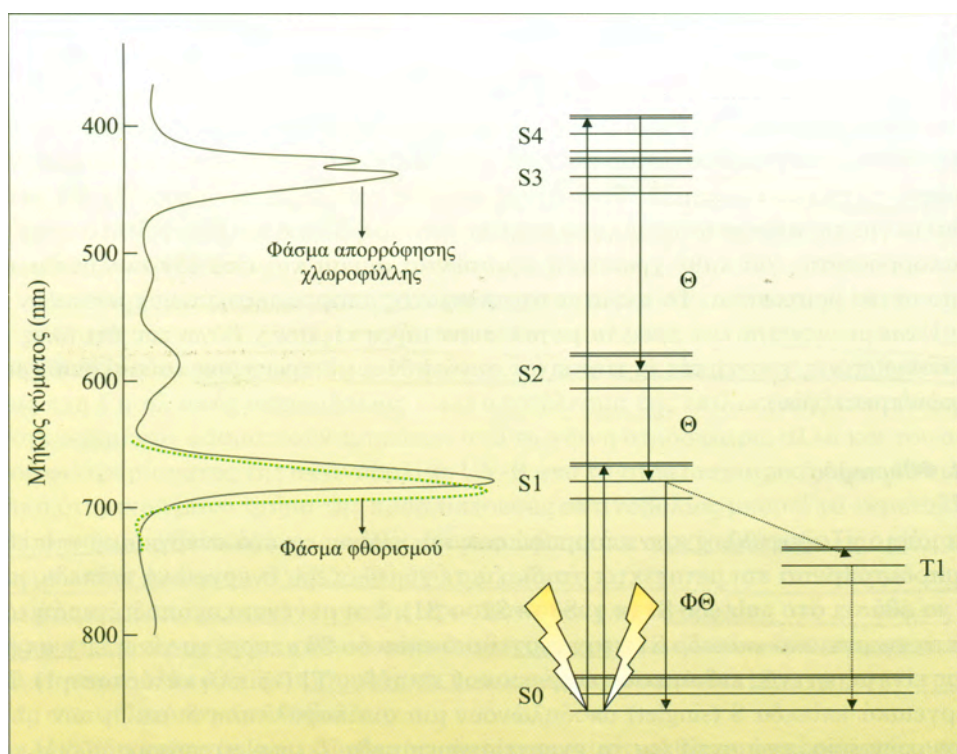
V. Μηχανισμός της φωτοσύνθεσης

Το πρώτο στάδιο της φωτοσύνθεσης είναι η απορρόφηση της φωτεινής ενέργειας από τις φωτοσυνθετικές χρωστικές στα φωτοσυλλεκτικά σύμπλοκα και η διέγερση τους. Στη συνέχεια έχουμε τη μεταφορά της ενέργειας διέγερσης στα κέντρα αντίδρασης των δύο φωτοσυστημάτων (PSI και PSII) και τη φωτοσυνθετική ροή ηλεκτρονίων με αποτέλεσμα τη μετατροπή της φωτεινής ενέργειας σε χημική μέσω της φωτοφωσφορυλίωσης. Η ενέργεια αυτή χρησιμοποιείται στη μετατροπή του CO₂ σε υδατάνθρακες μέσω του κύκλου του Calvin (Ρουμπελάκη-Αγγελάκη 2003).

VI. Φθορισμός της χλωροφύλλης

Οι χλωροφύλλες *a* και *b* αποτελούν τις κυριότερες φωτοσυνθετικές χρωστικές και λειτουργούν ουσιαστικά ως φωτοσυλλέκτες στα δύο φωτοσυστήματα σχηματίζοντας έτσι τις αντέννες (Διαμαντοπούλου 2012). Η κυριότερη χρωστική είναι η χλωροφύλλη *a* (Chl *a*), η οποία απορροφά φωτόνια από την ηλιακή ακτινοβολία και μεταφέρει ενέργεια στα κέντρα αντίδρασης των φωτοσυστημάτων (Rabinowitch and Govindjee 1969). Το μόριο της χλωροφύλλης απορροφά ενέργεια, διεγείρεται και φθάνει σε ένα ενεργειακό επίπεδο S_n . Στη συνέχεια αποδιεγείρεται και μεταπίπτει σταδιακά σε χαμηλότερα ενεργειακά επίπεδα ($S_4 \rightarrow S_3 \rightarrow S_2 \rightarrow S_1$ βλ. **εικόνα 4**). Όπως φαίνεται και στην εικόνα η αποδιέγερση από το ενεργειακό επίπεδο S_1 στο ενεργειακό επίπεδο S_0 μπορεί να γίνει με δύο τρόπους είτε απευθείας είτε μέσω ενός ενδιάμεσου ενεργειακού επιπέδου T_1 (κατάσταση τριπλέτας). Η διαφορά μεταξύ των δύο επιπέδων βρίσκεται στη διάταξη των ηλεκτρονίων τους, τα ενεργειακά επίπεδα S_1 υποδηλώνουν μια αντιπαράλληλη διάταξη των ηλεκτρονιακών spin ενώ αντίθετα στο ενεργειακό επίπεδο T_1 έχουν παράλληλα spin (Ρουμπελάκη-Αγγελάκη 2003). Η αποδιέγερση του μορίου της χλωροφύλλης από τα υψηλά ενεργειακά επίπεδα μέχρι το ενεργειακό επίπεδο S_1 μπορεί να γίνει είτε με τη μεταφορά ενέργειας σε ένα γειτονικό μόριο, είτε με τη μεταφορά ενέργειας στα κέντρα αντίδρασης για φωτοχημεία, είτε από απελευθέρωση ενέργειας υπό τη μορφή θερμότητας. Η απελευθέρωση ενέργειας από τη μετάπτωση από το ενεργειακό επίπεδο $S_1 \rightarrow S_0$ μπορεί να γίνει επίσης με τη μορφή ακτινοβολίας υπό τη μορφή φθορισμού. Το μήκος κύματος του φθορισμού είναι μεγαλύτερο (δηλαδή μικρότερης ενέργειας) από το αντίστοιχο μήκος κύματος για την ενεργειακή

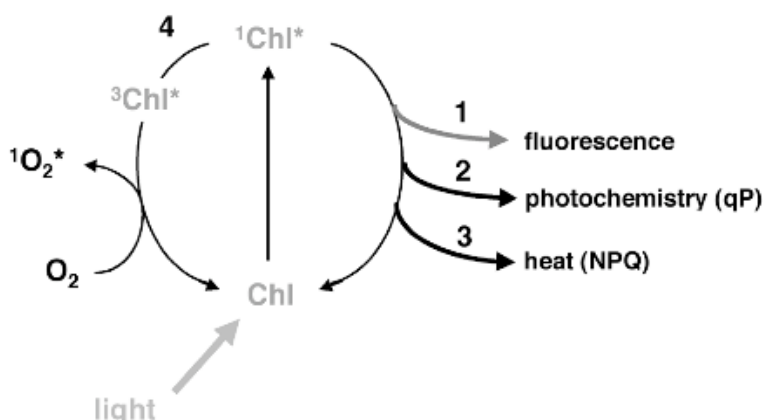
διέγερση του μορίου. Δηλαδή η διέγερση του μορίου της χλωροφύλλης είτε με κυανή ακτινοβολία (S3, S4) είτε με ερυθρή (S1) δίνει το ίδιο φάσμα φθορισμού εφόσον φθορισμό έχουμε μόνο κατά την αποδιέγερση από το ενεργειακό επίπεδο S1 στο ενεργειακό επίπεδο S0 (**εικόνα 4**). Για τα περισσότερα μόρια των φωτοσυνθετικών χρωστικών ο φθορισμός της χλωροφύλλης εμφανίζεται σε nanoseconds ενώ η φωτοχημεία εμφανίζεται σε picoseconds δηλαδή 1000 φορές πιο γρήγορα και επομένως ο φθορισμός της χλωροφύλλης είναι μικρός. Το μόριο της χλωροφύλλης εάν δεν αποδιεγερθεί με έναν από τους τρεις τρόπους (**εικόνα 5**) δηλαδή μέσω του φθορισμού, με φωτοχημεία ή μέσω θερμότητας τότε μεταπίπτει στο επίπεδο της τριπλέτας στο οποίο μπορεί να παραμείνει για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα αλλά σε αυτή την κατάσταση αντιδρά με το



Εικόνα 4. Διάγραμμα ενεργειακών επιπέδων των χλωροφυλλών και σχέση του φάσματος απορρόφησης των χρωστικών με τα ενεργειακά επίπεδα (S4, S3, S2, S1, S0). Τα ενεργειακά επίπεδα S1 υποδηλώνουν μια αντιπαράλληλη διάταξη των ηλεκτρονιακών spin ενώ αντίθετα στο ενεργειακό επίπεδο T1 έχουν παράλληλα spin (Ρουμπελάκη-Αγγελάκη 2003).

μοριακό οξυγόνο O_2 και σχηματίζεται η μονήρης μορφή οξυγόνου, η οποία είναι μια από τις ενεργές μορφές οξυγόνου (ROS).

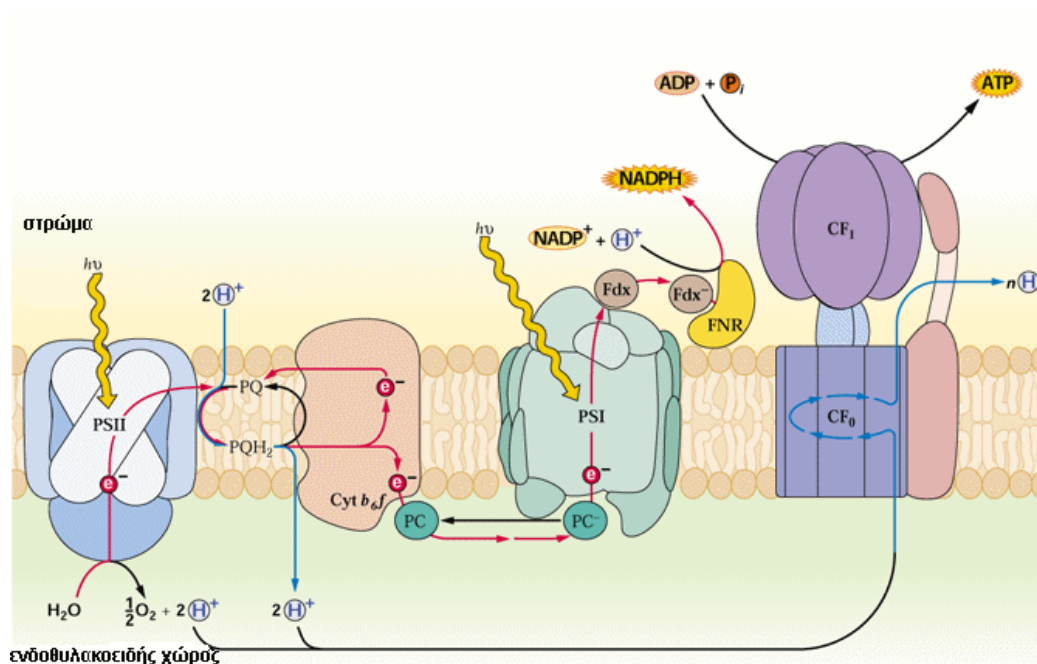
Το γεγονός ότι οι μετρήσεις του φθορισμού της χλωροφύλλης μπορούν να χρησιμοποιηθούν, ώστε να υπολογιστεί γρήγορα η πραγματική απόδοση φωτονίων του PSII (Genty et al. 1989), καθώς και το ότι αυτή η πραγματική απόδοση φωτονίων σχετίζεται με την αφομοίωση του CO_2 (Genty et al. 1989) οδήγησε στην ευρεία χρήση του φθορισμού της χλωροφύλλης για την εξέταση της φωτοσυνθετικής απόδοσης των φύλλων στο εργαστήριο, σε ελεγχόμενο περιβάλλον, καθώς και σε συνθήκες πεδίου (Σπερδούλη 2011).



Εικόνα 5. Πιθανές τύχες της διεγερμένης χλωροφύλλης. Όταν η χλωροφύλλη απορροφά ενέργεια διεγείρεται από την απλή κατάσταση της (singlet excited state) $1Chl^*$. Από αυτή την κατάσταση έχει πολλούς πιθανούς τρόπους για να επανέλθει στην αρχική της κατάσταση. 1) μέσω φθορισμού 2) η ενέργεια διέγερσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως “καύσιμο” για τις αντιδράσεις φωτοσύνθεσης 3) αποδιέγερση μέσω απελευθέρωσης θερμότητας και οι 2 αυτοί μηχανισμοί μειώνουν την ποσότητα φθορισμού. Για το λόγο αυτό αναφέρονται ως qP (πίεση αποδιέγερσης) και NPQ (φωτοχημική απόσβεση) του φθορισμού της χλωροφύλλης. Τέλος η $1Chl^*$ μπορεί να παράγει $3Chl^*$ η οποία μπορεί να παράγει $1O_2^*$, μια πολύ ενεργή μορφή οξυγόνου (Muller et al. 2001).

VII. Φωτεινές αντιδράσεις

Η φωτεινή ενέργεια από τα φωτοσυλλεκτικά σύμπλοκα (LHCI και LHCII) που μεταφέρεται στα κέντρα αντίδρασης (RCI και RCII) είναι αυτή που χρησιμοποιείται για φωτοχημεία στα φωτοσυστήματα I και II (PSI και PSII). Μετά τη διέγερση του μορίου της χλωροφύλλης στο RCII και τη μεταφορά ενός ηλεκτρονίου στον πρώτο δέκτη ηλεκτρονίων, την κινονη Α (QA) πραγματοποιείται ο διαχωρισμός φορτίου. Η αντικατάσταση του ηλεκτρονίου στο RCII γίνεται από ηλεκτρόνιο το οποίο προέρχεται από την οξείδωση του H_2O . Η οξείδωση του νερού στο PSII έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή οξυγόνου, πρωτονίων και ηλεκτρονίων με αποτέλεσμα τον εμπλουτισμό του ενδοθυλακοειδούς χώρου σε πρωτόνια (**εικόνα 6**).



Εικόνα 6. Απεικονίζεται η αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στους χλωροπλάστες καθώς και η ATP συνθάση στη θυλακοειδή μεμβράνη. Απεικονίζονται ακόμα τα τέσσερα μεμβρανικά συμπλέγματα PSII PSI το σύμπλεγμα του κυτοχρώματος b_6f και η ATP συνθάση (CF₁-CF₀). Τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται από το H_2O στο NADP^+ και ταυτόχρονα η μεταφορά αυτή συνοδεύεται από την εγκαθίδρυση διαφοράς συγκέντρωσης H^+ στις δύο πλευρές της μεμβράνης. Αυτή η ηλεκτροχημική βαθμίδωση χρησιμοποιείται τελικά για τη σύνθεση του ATP από την ATP συνθάση. Η μεταφορά ηλεκτρονίων απεικονίζεται με κόκκινη γραμμή ενώ η μετατόπιση H^+ με μπλέ γραμμή. Fdx, φερεδοξίνη και FNR φεροδοξίνη-NADP⁺ ρεδοουκτάση (Malkin and Niyogi 2000).

Η μεταφορά ηλεκτρονίου από την πλαστοκινόνη (PQ) στο κυτόχρωμα b_6f ($cytb_6f$) συνοδεύεται από παράλληλη μεταφορά πρωτονίων από το στρώμα στον ενδοθυλακοειδή χώρο γεγονός που έχει ως συνέπεια την περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης των πρωτονίων στον ενδοθυλακοειδή χώρο. Η μεταφορά των ηλεκτρονίων συνεχίζεται από το $cytb_6f$ στην πλαστοκυανίνη (PC) και από εκεί στο RCII με τελικό αποδέκτη το $NADP^+$ το οποίο ανάγεται σε NADPH. Η διαφορά της συγκέντρωσης πρωτονίων στον ενδοθυλακοειδή χώρο και στο στρώμα δηλαδή μεταξύ των δύο πλευρών της μεμβράνης αποτελεί την κινητήρια δύναμη πρωτονίων για τη σύνθεση του ATP από την ATP συνθάση (**εικόνα 6**) (Malkin and Niyogi 2000).

VIII. Κατανομή της ενέργειας αποδιέγερσης

Υπάρχουν 3 διεργασίες που μπορούν να πραγματοποιηθούν για να κατανεμηθεί η ενέργεια αποδιέγερσης. Η πρώτη διεργασία είναι η φωτοχημεία, η δεύτερη ο φθορισμός και τρίτη είναι αποβολή ενέργειας με μορφή θερμότητας ή μη ελεγχόμενη αποβολή. Κάθε διεργασία από αυτές χαρακτηρίζεται και από την απόδοση της. Η κβαντική απόδοση Φ μιας διεργασίας, κατά την οποία μόρια αποδίδουν την ενέργεια διεγερσεώς τους είναι το κλάσμα των διεγερμένων μορίων που αποσυντίθεται διαμέσου αυτής της διαδρομής (Τσέκος 2004). Μαθηματικά η κβαντική απόδοση μιας διεργασίας καθορίζεται ως εξής:

$$\Phi = \frac{\text{αριθμός προϊόντων που σχηματίζεται μέσω της διεργασίας}}{\text{αριθμός απορροφούμενων κβάντα}}$$

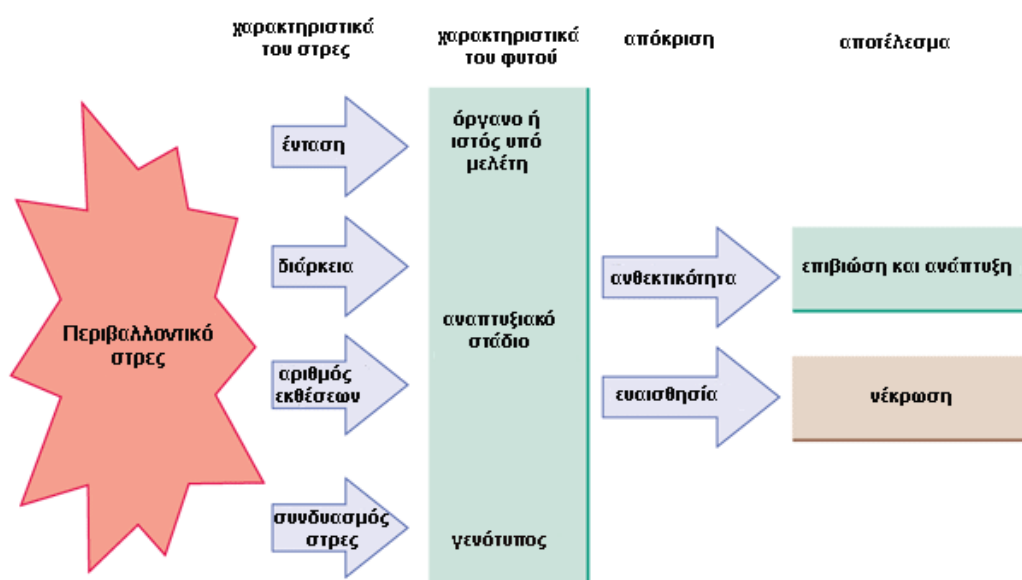
Σε λειτουργικούς χλωροπλάστες που διατηρούνται σε αμυδρό φώς, η κβαντική απόδοση της φωτοχημείας είναι περίπου 0.95, η κβαντική απόδοση του φθορισμού είναι 0.05 ή χαμηλότερη και οι άλλες διεργασίες έχουν αμελητέες αποδόσεις. Είναι φανερό πως η πλειοψηφία των διεγερμένων μορίων χλωροφύλλης κατευθύνεται στη φωτοχημεία.

Οι αποδόσεις των διεργασιών αυτών είναι γνωστές ως ΦPSII (απόδοση φωτονίων του φωτοσυστήματος II), ΦNPQ (απόδοση φωτονίων που χάνεται λόγω μη φωτοχημικής απόσβεσης και οφείλεται στην ελεγχόμενη αποβολή της ενέργειας διέγερσης υπο μορφή θερμότητας) και ΦNO (απόδοση φωτονίων που χάνεται για άλλες μη φωτοχημικές διεργασίες), δηλαδή η μη ελεγχόμενη αποβολή της ενέργειας διέγερσης

ΙΧ. Το αβιοτικό στρες

Τα φυτά υπόκεινται συχνά σε συνθήκες στρες που επηρεάζουν την ανάπτυξη και την αναπαραγωγή τους. Στρες είναι η όποια δυνητικά επιβλαβής για το φυτό κατάσταση του περιβάλλοντος. Το στρες μπορεί να είναι βιοτικό, που προέρχεται από άλλους οργανισμούς, ή αβιοτικό, που οφείλεται σε έλλειψη ή περίσσεια στο φυσικό ή χημικό περιβάλλον (Bray et al. 2000). Ανάμεσα στις αβιοτικές καταπονήσεις εντάσσονται η ξηρασία, η περίσσεια νερού στο έδαφος, οι υψηλές ή χαμηλές θερμοκρασίες, η αλατότητα, η έλλειψη θρεπτικών ουσιών στο έδαφος, η υψηλή ένταση φωτισμού ή το περιορισμένο φώς. Η ανθεκτικότητα ή η αντίσταση στο στρες εξαρτάται από το είδος του φυτού, το γενότυπο και το αναπτυξιακό στάδιο του (Bray et al. 2000). Όπως φαίνεται και στην **εικόνα 7** η διάρκεια, η ένταση, ο

αριθμός των εκθέσεων και τα είδη του στρες στα οποία υποβάλλεται το φυτό επηρεάζουν το πως θα αντιδράσει το φυτό. Ακόμα τα χαρακτηριστικά του φυτού όπως το όργανο ή ο ιστός αλλά και το αναπτυξιακό στάδιο και ο γενότυπος επίσης επηρεάζουν την απόκριση του φυτού. Τα φυτά αποκτούν ανθεκτικότητα απέναντι στις καταπονήσεις μέσω επαναπρογραμματισμού του μεταβολισμού τους και της έκφρασης των γονιδίων τους δημιουργώντας έτσι μια νέα ισορροπία μεταξύ αύξησης,



Εικόνα 7. Πολλοί παράγοντες καθορίζουν το πως θα αντιδράσει ένα φυτό στο περιβαλλοντικό στρες: ο γενότυπος και οι αναπτυξιακές καταστάσεις του φυτού, η διάρκεια και η ένταση του στρες, ο αριθμός έκθεσης του φυτού στο στρες, και οποιαδήποτε επιπρόσθετη επίδραση διαφορετικών ειδών στρες. Τα φυτά αποκρίνονται στο στρες μέσω μιας ποικιλίας μηχανισμών. Η αποτυχία στην προσπάθεια απόκρισης απέναντι στο στρες μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα τη νέκρωση του φυτού (Bray et al. 2000).

ανάπτυξης και επιβίωσης (Mazzucotelli et al. 2008). Η προσαρμογή των φυτών απαιτεί μια σειρά από μοριακούς μηχανισμούς οι οποίοι ενεργοποιούν μηχανισμούς απόκρισης για την αποκατάσταση της ομοιόστασης και προστατεύουν και επιδιορθώνουν πρωτεΐνες και μεμβράνες (Vinocour and

Altman 2005). Η κατανόηση αυτών των μηχανισμών επαναπρογραμματισμού κάτω από την διαρκή αλλαγή περιβαλλοντικών συνθηκών έχει αποτελέσει θέμα ερευνητικού ενδιαφέροντος για αρκετές δεκαετίες . Ωστόσο υπάρχει ακόμα μεγάλο κενό στις γνώσεις γύρω από το ζήτημα και δε μπορεί ακόμα να προβλεφθεί ο τρόπος με τον οποίο θα ανταπεξέλθει ένα φυτό σε τέτοιες προκλήσεις (Ahuja et al. 2010).

Ο Lichtenthaler (1998) πρότεινε τέσσερα στάδια στην αντίδραση του φυτού απέναντι στο στρες:

1. Το στάδιο του συναγερμού (alarm stage) όπου ο μεταβολισμός αποκλίνει από την κανονική του πορεία και το φυτό οδηγείται σε οξεία βλάβη αν δεν καταφέρει να περάσει στο επόμενο στάδιο.
2. Το στάδιο της αντοχής (resistance) όπου υπάρχει μια γενικότερη αναδιάταξη με διάφορες συνιστώσες (εγκλιματισμό, προσαρμογή, επιδιόρθωση).
3. Το στάδιο της εξάντλησης ή τελικό (exhaustion) όπου εξαντλείται η ικανότητα προσαρμογής του φυτού , καθώς η υπερβολική ένταση του στρες προκαλεί χρόνια βλάβη και τελικά νέκρωση των κυττάρων.
4. Το στάδιο της ανάνηψης ή αναγέννησης (regeneration) όπου έχουμε μερική ή ολοκληρωτική επαναφορά των φυσιολογικών λειτουργιών σε κανονικά επίπεδα, εφόσον έχουμε αναστολή του στρες.

Χ. Το οξειδωτικό στρες

Το οξυγόνο χρησιμοποιείται από όλους τους αερόβιους οργανισμούς ως δέκτης ηλεκτρονίων , ταυτόχρονα όμως παρατηρούνται ανηγμένες μορφές

οξυγόνου οι οποίες είναι γνωστές ως ενεργές μορφές οξυγόνου (ROS reactive oxygen species) και είναι ιδιαίτερα τοξικές. Οι ενεργές μορφές οξυγόνου σχηματίζονται κατά τη διάρκεια ατελούς αναγωγής του οξυγόνου ή της οξειδωσης του νερού απο τη μιτοχονδριακή ή χλωροπλαστική αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων. Ο σχηματισμός του μονήρους οξυγόνου ($^1\text{O}_2$) στη συνέχεια διεγείρει το σχηματισμό άλλων μορφών ROS όπως υπεροξειδίου του υδρογόνου H_2O_2 , υπεροξειδική ρίζα του οξυγόνου $\text{O}_2^{\cdot-}$ και άλλων (Bray et al. 2000). Η υπεροξειδική ρίζα του οξυγόνου και οι άλλες ενεργές μορφές οξυγόνου, είναι μόρια μικρού μοριακού βάρους τα οποία μεσολαβούν στη μεταγωγή σήματος, αλλά όταν βρίσκονται σε υπερβολικές ποσότητες μπορεί να προκαλέσουν οξειδωτικές βλάβες σε πρωτεΐνες, λιπίδια RNA και DNA (Taiz and Zeiger 2010). Οι παράγοντες που προκαλούν την παραγωγή ROS και το οξειδωτικό στρες είναι ενδογενείς και εξωγενείς. Οι ενδογενείς μπορεί να είναι διάφορες οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα στο φυτό ενώ οι εξωγενείς μπορεί να είναι: ακτινοβολία UV, τα βαρέα μέταλλα, οι ακραίες θερμοκρασίες, ξηρασία, υψηλή ένταση φωτισμού, τα ζιζανιοκτόνα, οι ατμοσφαιρικοί ρύποι και η υψηλότερη της συνήθους συγκέντρωση οξυγόνου καθώς και οι προσβολές από παθογόνα.

XI. Τα φυτοφάρμακα

Ως φυτοφάρμακα ορίζονται οι ανόργανες ή οργανικές ουσίες φυσικής προέλευσης ή συνθετικές, που χρησιμοποιούνται εναντίον ασθενειών και ζιζανίων των φυτών. Τα φυτοφάρμακα χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες:

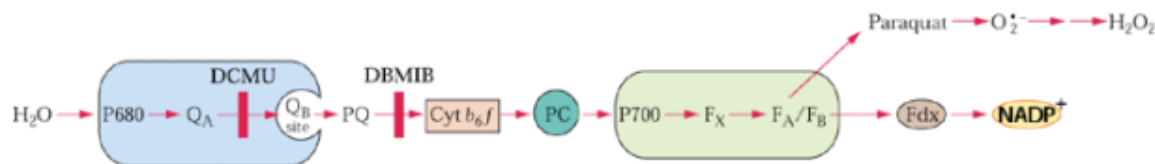
1. Τα ζιζανιοκτόνα (όπως το paraquat): δρουν ενάντια σε ζιζάνια (ανεπιθύμητα φυτά) που αναπτύσσονται σε καλλιέργειες
2. Τα εντομοκτόνα: δρουν ενάντια σε έντομα που τρέφονται από φυτά
3. Τα παρασιτοκτόνα ή μυκητοκτόνα: δρουν ενάντια σε ζωικά ή φυτικά παράσιτα που ζουν εις βάρος του φυτού.

XII. Το ζιζανιοκτόνο παρακουάτ (paraquat, Pq)

Το paraquat (1,1'-διμεθυλο-4, 4'-διπυριδίνιο διχλωρίδιο), είναι ένα χημικό ζιζανιοκτόνο που χρησιμοποιείται για τον έλεγχο ζιζανίων σε περισσότερες από 100 καλλιέργειες σε όλα τα κλίματα, όπως τα σιτηρά, τα φρούτα και τα λαχανικά. Τα ζιζάνια υποσκιάζουν τα φυτά λαμβάνοντας το νερό και τα θρεπτικά τους στοιχεία και δυσκολεύουν τη συγκομιδή. Το Pq, γνωστό και ως μεθυλοβιολογόνο, είναι ένα από τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα ζιζανιοκτόνα στον κόσμο και έχει εγκριθεί για τη χρήση του σε περισσότερες από εκατό χώρες. Η σωστή του χρήση το καθιστά ασφαλές για το περιβάλλον και τα καλλιεργούμενα φυτά. Η χρήση του όμως σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις μπορεί να προξενήσει προβλήματα στα φυτά.

Το Pq αποτελεί μια από τις πολλές ενώσεις που δρουν ως αναστολείς της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων στους χλωροπλάστες. Πιο συγκεκριμένα το Pq δρα εμποδίζοντας την αναγωγή της φερρεδοξίνης, η οποία αποτελεί τον τελικό δέκτη ηλεκτρονίων του PSI. Η ικανότητα του αυτή βασίζεται στο γεγονός ότι το Pq λαμβάνοντας τα ηλεκτρόνια μετατρέπεται σε ρίζα η οποία αντιδρά αμέσως με το οξυγόνο με αποτέλεσμα το σχηματισμό υπεροξειδικής ρίζας του οξυγόνου $O_2^{\bullet -}$ και άλλων ενεργών μορφών οξυγόνου

(ROS). Η υπεροξειδική ρίζα του οξυγόνου, είναι ιδιαίτερα δραστική και επιβλαβής για τη φωτοσυνθετική μηχανή (**εικόνα 8**) (Malkin and Niyogi 2000).



Εικόνα 8. Θέσεις δράσης των αναστολέων της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων στους χλωροπλάστες. Το Pq λαμβάνοντας τα ηλεκτρόνια μετατρέπεται σε ρίζα η οποία αντιδρά αμέσως με το οξυγόνο με αποτέλεσμα το σχηματισμό υπεροξειδικής ρίζας του οξυγόνου και άλλων ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS) (Malkin and Niyogi 2000).

XIII. Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της διπλωματικής εργασίας είναι η διερεύνηση της επίδρασης του γονιδίου *AtHesp* του *Arabidopsis thaliana* στη λειτουργία του φωτοσυστήματος II σε φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης και σε συνθήκες οξειδωτικού stress. Για το σκοπό αυτό θα χρησιμοποιηθούν φυτά αγρίου τύπου Col-0 και μεταλλάγματα knock down του γονιδίου *AtHesp*, τα οποία θα υποβληθούν σε οξειδωτική καταπόνηση με τη χρήση του ζιζανιοκτόνου παρακουάτ (Pq). Για την εκτίμηση των επιπτώσεων του γονιδίου *AtHesp* στη λειτουργία του φωτοσυστήματος II θα μετρηθούν με τη μέθοδο της απεικόνισης του φθορισμού της χλωροφύλλης: η απόδοση φωτονίων του φωτοσυστήματος II (Φ_{PSII}), η απόδοση φωτονίων που χάνεται λόγω μη φωτοχημικής απόσβεσης (Φ_{NPQ}), η απόδοση φωτονίων που χάνεται για άλλες μη φωτοχημικές διαδικασίες (Φ_{NO}), η φωτοχημική απόσβεση (q_p), η μη-φωτοχημική απόσβεση (NPQ) και ο ρυθμός μεταφοράς ηλεκτρονίων (ETR).

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

I. Φυτικό υλικό

Ως φυτικό υλικό, χρησιμοποιήθηκε ο οικότυπος *Col-0* του *Arabidopsis thaliana* και το μετάλλαγμα *AtHesp* (knock down γονίδιο εσπερίνης) (εικόνα 9). Στα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν φυτά ηλικίας τεσσάρων εβδομάδων.



Εικόνα 9. Ο οικότυπος *Col-0* του *Arabidopsis thaliana* (αριστερά) και το μετάλλαγμα *AtHesp* (δεξιά).

II. Συνθήκες ανάπτυξης

Σπέρματα του οικότυπου *Col-0* του *Arabidopsis thaliana* και του μεταλλάγματος *AtHesp* τοποθετήθηκαν για δύο ημέρες σε θερμοκρασία 4°C και στη συνέχεια φυτεύτηκαν σε γλάστρες, χωρητικότητας δύο λίτρων, με χώμα εμπορίου. Η ανάπτυξη των φυτών έγινε σε θάλαμο ανάπτυξης Conviron EF7 με

σταθερή φωτοπερίοδο (16 ώρες φως και 8 ώρες σκοτάδι), θερμοκρασία $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ κατά τη διάρκεια της ημέρας και $18\pm 1^{\circ}\text{C}$ κατά τη διάρκεια της νύχτας και με σχετική υγρασία $50\pm 5\%$ και $65\pm 5\%$ κατά τη διάρκεια της ημέρας και της νύχτας, αντίστοιχα. Η ένταση φωτισμού στο εσωτερικό του θαλάμου ήταν $120\pm 20 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ sec}^{-1}$. Τα φυτά ποτίζονταν με ψεκασμό με το χέρι κάθε δύο ημέρες.

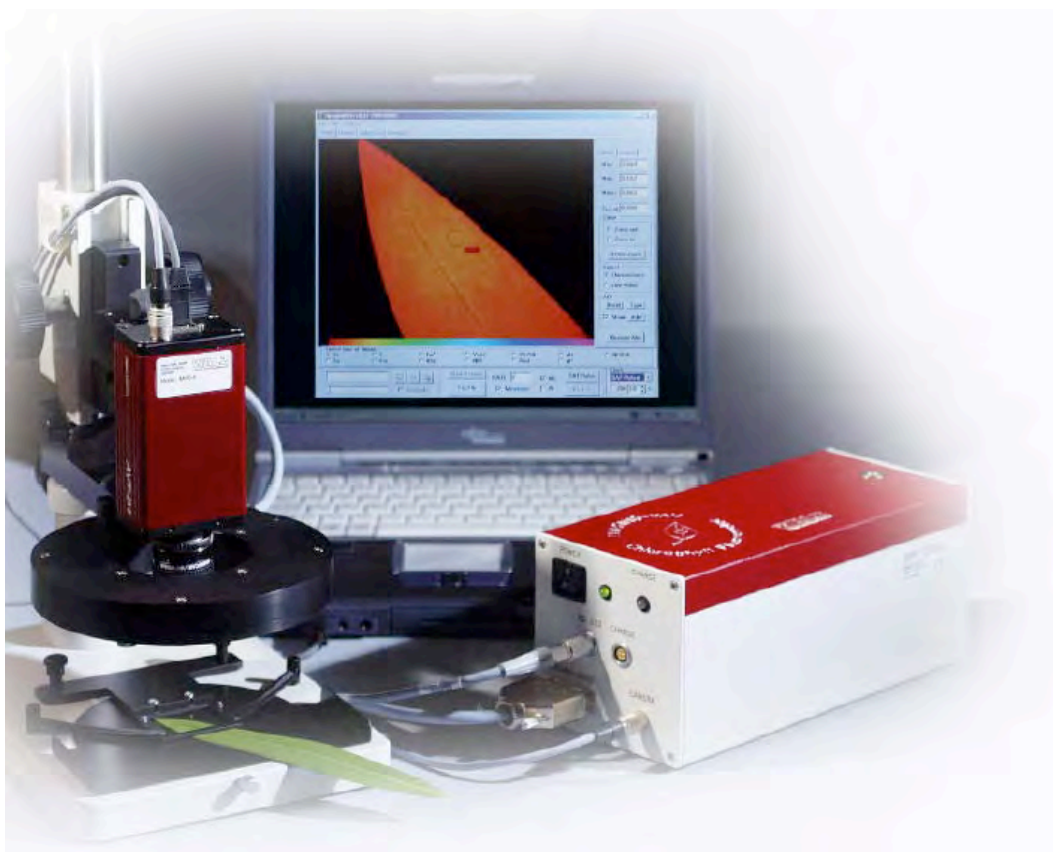
III. Επίδραση παρακουάτ (paraquat, Pq)

Η συγκέντρωση του paraquat που χρησιμοποιήθηκε για τον ψεκασμό των φυτών Col-0 και *AtHesp* του *Arabidopsis thaliana* ήταν 1 mM και αντιπροσωπεύει την αντίστοιχη συγκέντρωση που χρησιμοποιείται για ψεκασμό στους αγρούς (Tomlin 2000, Barbagallo et al. 2003).

IV. Μελέτη της φωτοσυνθετικής απόδοσης με τη μέθοδο της απεικόνισης του φθορισμού της χλωροφύλλης

Η λήψη των τιμών και των εικόνων των παραμέτρων φθορισμού της χλωροφύλλης έγινε με τη χρήση του φθορισμόμετρου imaging-PAM (Walz, Effeltrich, Γερμανία) (**εικόνα 10**). όπως περιγράφηκε από τους Moustakas et al. (2011) και Σπερδούλη (2011). Οι δίοδοι φωτός ήταν τοποθετημένες σε κυκλική διάταξη και σε σταθερή απόσταση από την περιοχή του φύλλου. Οι δύο εξωτερικοί κύκλοι (συνολικά 96 δίοδοι φωτός, 96 LEDs) παρείχαν δέσμη φωτός χαμηλής έντασης, δέσμη ακτινικού φωτός, καθώς και κορεσμένη παλμική δέσμη,

με μέγιστο μήκος κύματος στα 470 nm. Ο εσωτερικός κύκλος (συνολικά 16 δίοδοι φωτός, LEDs) παρείχε τη διαμορφωμένη δέσμη φωτός για την εκτίμηση της απορρόφησης της φωτοσυνθετικά ενεργής ακτινοβολίας (PAR) σε μήκη κύματος 650 nm και σε 780 nm. Η ψηφιοποίηση της εικόνας έγινε με CCD κάμερα που είχε ανάλυση 640 X 480 εικονοστοιχεία (pixel). Η ανάλυση των εικόνων των παραμέτρων φθορισμού έγινε με τη βοήθεια μιας χρωματικής κλίμακα που κυμαίνεται από το μαύρο (τιμή εικονοστοιχείου 0.000) και μέσω του κόκκινου, κίτρινου, πράσινου, και μπλε φθάνει στο ροζ (τελειώνοντας με τιμή εικονοστοιχείου 1.000). Τα φύλλα του *Arabidopsis* έμειναν στο σκοτάδι για 15 min



Εικόνα 10. Φθορισμόμετρο χλωροφύλλης Imaging-PAM.

πριν από τη μέτρηση. Πάνω στο φύλλο επιλέχθηκαν πέντε περιοχές ενδιαφέροντος (Π.Ε), μία στο κέντρο του φύλλου, δύο στο εξωτερικό τμήμα του μπροστινού μέρους και δύο στο εξωτερικό τμήμα του πίσω μέρους του φύλλου προκειμένου να αξιολογηθεί η χωρική ετερογένεια. Στην έναρξη κάθε μέτρησης το φύλλο εκτέθηκε σε δέσμη φωτός χαμηλής έντασης και συχνότητα διαμόρφωσης 2 Hz για τον προσδιορισμό του F_o (ελάχιστος φθορισμός στο σκοτάδι). Στη συνέχεια κορεσμένη παλμική δέσμη (800ms) λευκού φωτός ($2400 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{sec}^{-1}$) εφαρμόστηκε για να προσδιοριστεί το F_m (μέγιστος φθορισμός στο σκοτάδι). Η μέγιστη απόδοση φωτονίων (F_v/F_m) προσδιορίστηκε ως $(F_m - F_o)/F_m$. Για τον υπολογισμό των διάφορων παραμέτρων φθορισμού έγινε επίδραση φωτοσυνθετικά ενεργής ακτινοβολίας (PAR) έντασης $120 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ για χρονική διάρκεια 3 λεπτά. Στο τέλος εφαρμόστηκε κορεσμένη παλμική δέσμη ώστε να καθοριστεί ο μέγιστος φθορισμός κατά τη διάρκεια του ακτινικού φωτισμού (F_m') και ο φθορισμός χλωροφύλλης κατά τη διάρκεια του ακτινικού φωτισμού (F_s) καθώς και οι άλλες παράμετροι φωτισμού και ακολούθησε η λήψη και η αποθήκευση των παραμέτρων φθορισμού. Η απόδοση φωτονίων (Φ_{PSII}) η οποία μετράει το ποσοστό της απορροφούμενης από τη χλωροφύλλη ενέργειας την οποία το φωτοσύστημα II (PSII) χρησιμοποιεί για φωτοχημικές διαδικασίες, υπολογίστηκε ως $(F_m' - F_s)/F_m'$ σύμφωνα με τους Genty et al. 1989. Η φωτοχημική απόσβεση, q_p , η οποία είναι ένα μέτρο του μέρους των ανοιχτών κέντρων αντίδρασης του PSII, υπολογίστηκε ως $(F_m' - F_s)/(F_m' - F_o')$. Για να καθορισθεί το F_o' σωστά, θα ήταν απαραίτητο να παύσει η επίδραση της δέσμης ακτινικού φωτός και να επανοξειδωθεί το PSII με τη βοήθεια υπέρυθρου φωτός (μήκος κύματος,

$\lambda > 700$ nm), αλλά αυτό δεν είναι εφικτό με το imaging-PAM, δεδομένου ότι το υπέρυθρο φως θα διαπερνούσε τον ανιχνευτή της CCD κάμερας και θα προκαλούσε σοβαρές αλλοιώσεις στις εικόνες φθορισμού (Calatayud et al. 2006). Για αυτό το λόγο η τιμή F_o' υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας την προσέγγιση των Oxborough and Baker (1997) $F_o' = F_o / (F_v/F_m + F_o/F_m')$. Η παράμετρος q_L , η οποία υπολογίζει το τμήμα των ανοιχτών κέντρων αντίδρασης του PSII και βασίζεται στο μοντέλο «λιμνών», υπολογίστηκε σύμφωνα με τους Kramer et al. (2004) ως, $(F_m' - F_s/F_m' - F_o')(F_o'/F_s)$.

Η παράμετρος NPQ η οποία μετράει τη μη-φωτοχημική απόσβεση που αντιπροσωπεύει το διασκεδασμό θερμότητας της ενέργειας διέγερσης στο φωτοσυλλεκτικό σύμπλοκο (αντέννες) υπολογίστηκε ως $(F_m - F_m')/F_m'$. Η απόδοση φωτονίων που χάνεται λόγω μη φωτοχημικής απόσβεσης και οφείλεται σε μειωμένη ρύθμιση του PSII (Φ_{NPQ}) υπολογίστηκε από την εξίσωση $\Phi_{NPQ} = 1 - \Phi_{PSII} - 1/[NPQ + 1 + q_L(F_m/F_o - 1)]$ και η παράμετρος Φ_{NO} , δηλαδή η απόδοση φωτονίων που χάνεται για άλλες μη φωτοχημικές διαδικασίες, υπολογίστηκε ως $1/[NPQ + 1 + q_L(F_m/F_o - 1)]$ (Kramer et al. 2004). Ο ρυθμός μεταφοράς ηλεκτρονίων στο PSII (ETR) υπολογίστηκε ως $0.5 \times \Phi_{PSI} \times PAR \times 0.84$.

Μετρήθηκε επίσης η παράμετρος $1 - q_p$, η οποία εκτιμά την σχετική κατάσταση αναγωγής της QA, της πρώτης σταθερής κινόνης η οποία είναι δέκτης ηλεκτρονίων του PSII (Dietz et al. 1985). Αυτή η παράμετρος ($1 - q_p$) αναφέρεται ως πίεση αποδιέγερσης του PSII και αντανakλά την οξειδοαναγωγική ισορροπία της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων (Schreiber et al. 1994).

V. Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων

Κάθε τιμή μέτρησης είναι ο μέσος όρος από τουλάχιστον τέσσερις επαναλήψεις μαζί με το τυπικό σφάλμα (standard error SE). Οι μετρήσεις του φθορισμού της χλωροφύλλης αντιπροσωπεύουν μέσες τιμές ($n=4$) από δύο ανεξάρτητα πειράματα με δύο δείγματα φύλλων (καθένα με πέντε περιοχές ενδιαφέροντος, Π.Ε), από δύο διαφορετικά φυτά, ανά μεταχείριση ανά πείραμα. Η στατιστική επεξεργασία των δεδομένων έγινε με τη βοήθεια του κριτηρίου t (student's t -test) για επίπεδο πιθανότητας $P<0.05$ και $P<0.001$.

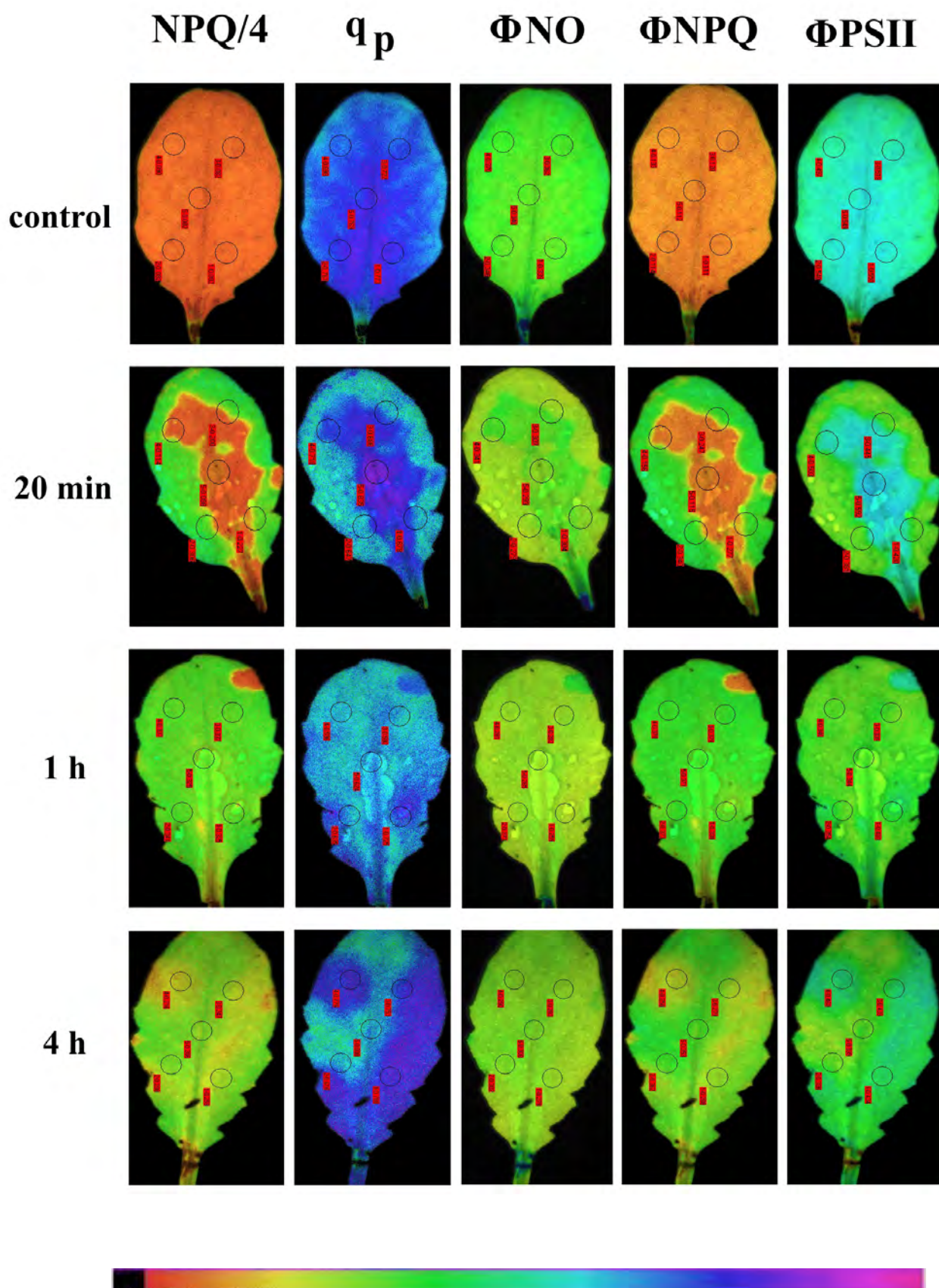
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

I. Επίδραση του Pq στον οικότυπο Col-0 του *Arabidopsis thaliana*

Για τη μελέτη των επιπτώσεων του Pq στη φωτοσυνθετική απόδοση των φυτών Col-0 του *Arabidopsis thaliana* χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της απεικόνισης του φθορισμού της χλωροφύλλης. Αντιπροσωπευτικές εικόνες φθορισμού χλωροφύλλης των παραμέτρων της μη φωτοχημικής απόσβεσης (NPQ/4), της φωτοχημικής απόσβεσης (q_P), της απόδοσης φωτονίων που χάνονται για άλλες μη φωτοχημικές διαδικασίες στο PSII (Φ_{NO}), της απόδοσης φωτονίων που χάνονται λόγω μη φωτοχημικής απόσβεσης στο PSII (Φ_{NPQ}) και της απόδοσης φωτονίων στο PSII (Φ_{PSII}) σε ένταση ακτινοβολίας $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$, από φύλλα μάρτυρες (control) και μετά από 20 λεπτά, 1 ώρα και 4 ώρες από τον ψεκασμό με Pq των φύλλων του *Arabidopsis thaliana* παρουσιάζονται στην **εικόνα 11**.

I 1. Επίδραση του Pq στην κατανομή ενέργειας του PSII

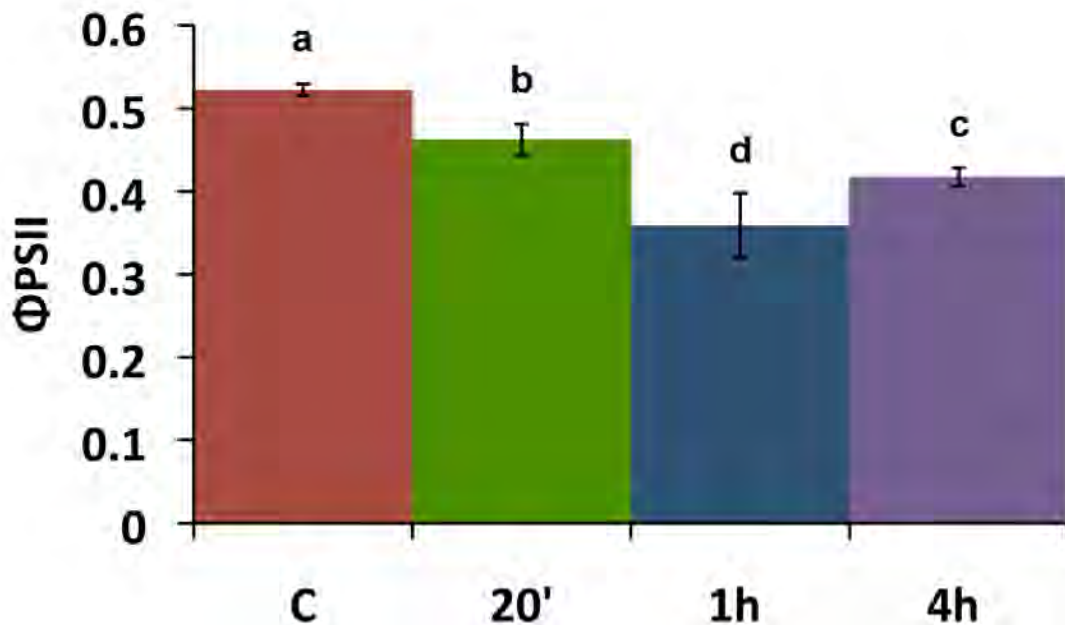
Οι επιπτώσεις του Pq στην κατανομή της ενέργειας του PSII μελετήθηκαν σε συνάρτηση με το χρόνο μετά την επίδραση του Pq. Συγκεκριμένα προσδιορίστηκε το ποσοστό της ενέργειας που χρησιμοποιείται για φωτοχημεία



Εικόνα 11: Αντιπροσωπευτικές εικόνες φθορισμού χλωροφύλλης των παραμέτρων NPQ/4, q_p , Φ_{NO} , Φ_{NPQ} και Φ_{PSII} (μετά από 3 min σε ένταση ακτινοβολίας $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$) από φύλλα μάρτυρες (control) και μετά από 20 λεπτά, 1 ώρα και 4 ώρες από τον ψεκασμό με Pq των φύλλων Col-0 του *Arabidopsis thaliana* ηλικίας τεσσάρων εβδομάδων. Η χρωματική κλίμακα στη βάση των εικόνων κυμαίνεται από μαύρο (τιμή εικονοστοιχείου 0.0) μέχρι μωβ (τιμή εικονοστοιχείου 1.0). Οι πέντε κύκλοι σε κάθε εικόνα αντιστοιχούν σε πέντε περιοχές ενδιαφέροντος με τις αντίστοιχες τιμές των παραμέτρων φθορισμού. Στις εικόνες φθορισμού της χλωροφύλλης μετά από τον ψεκασμό με Pq παρουσιάζεται η χωρική ετερογένεια και οι χρονικές μεταβολές μετά από τον ψεκασμό.

δηλαδή η απόδοση φωτονίων του φωτοσυστήματος II (Φ_{PSII}), η απόδοση φωτονίων που χάνεται λόγω μη φωτοχημικής απόσβεσης και οφείλεται στην ελεγχόμενη αποβολή της ενέργειας διέγερσης υπο μορφή θερμότητας (Φ_{NPQ}) και η απόδοση φωτονίων που χάνεται για άλλες μη φωτοχημικές διεργασίες (Φ_{NO}), δηλαδή η μη ελεγχόμενη αποβολή της ενέργειας διέγερσης.

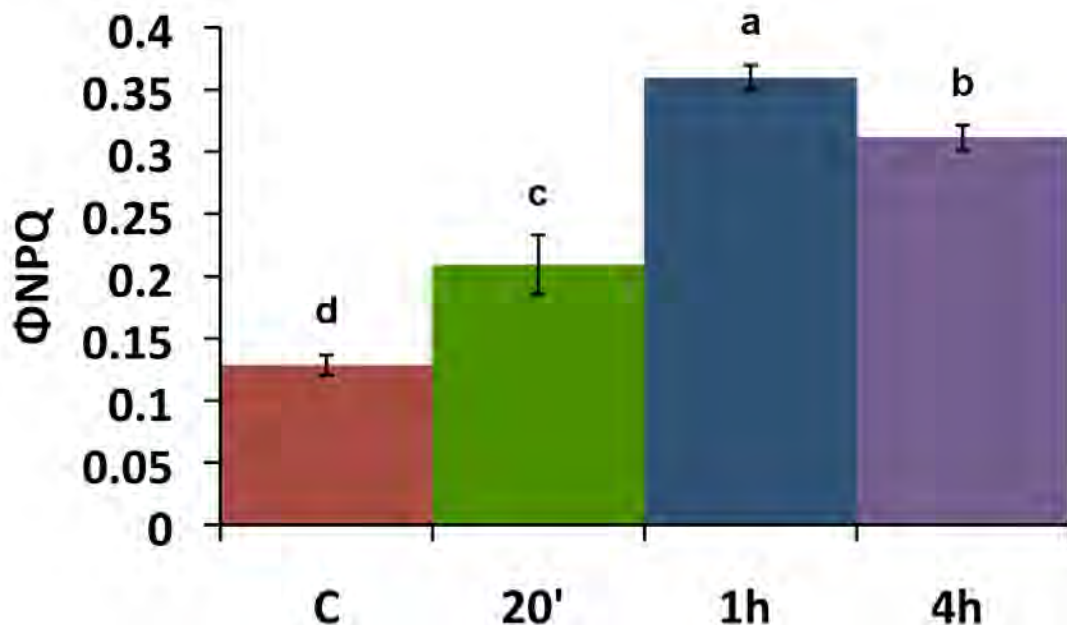
Η επίδραση 1mM Pq στην απόδοση των φωτονίων του $PSII$ μελετήθηκε 20 λεπτά, 1 ώρα και 4 ώρες μετά από τον ψεκασμό των φύλλων του οικότυπου Col-0. Όπως φαίνεται στην **εικόνα 12** η απόδοση φωτονίων του $PSII$ 20 λεπτά μετά τον ψεκασμό μειώθηκε περίπου 11% ($P < 0.05$), ενώ 1 ώρα μετά παρατηρή-



Εικόνα 12. Μεταβολές στο Φ_{PSII} (απόδοση φωτονίων στο $PSII$), σε ένταση ακτινοβολίας $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$, σε φύλλα μάρτυρες (control) και μετά από 20 λεπτά, 1 ώρα και 4 ώρες από τον ψεκασμό με Pq των φύλλων του Col 0 ηλικίας τεσσάρων εβδομάδων. Τα δεδομένα είναι μέσοι όροι και τυπικά σφάλματα ($\pm SE$) από δύο διαφορετικά πειράματα με δύο φύλλα από κάθε μεταχείριση για κάθε πείραμα ($n=4$). Οι τιμές εκφράζουν το μέσο όρο $\pm SE$ (κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος από πέντε περιοχές ενδιαφέροντος από καθένα από τα τέσσερα φύλλα). Το SE σημειώνεται με μπάρες. Οι τιμές στις στήλες με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά σημαντικά ($P < 0.05$).

θηκε αύξηση της μείωσης (31%, $P < 0.001$) συγκριτικά πάντα με τα φυτά μάρτυρες. Ωστόσο 4 ώρες μετά τον ψεκασμό παρατηρήθηκε ανάκαμψη και η μείωση συγκριτικά με τα φυτά μάρτυρες περιορίστηκε στο 20% ($P < 0.001$). Δηλαδή η απόδοση φωτονίων του PSII 4 ώρες μετά τον ψεκασμό παρουσίασε αύξηση 16% συγκριτικά με την 1 ώρα μετά τον ψεκασμό ($P < 0.01$).

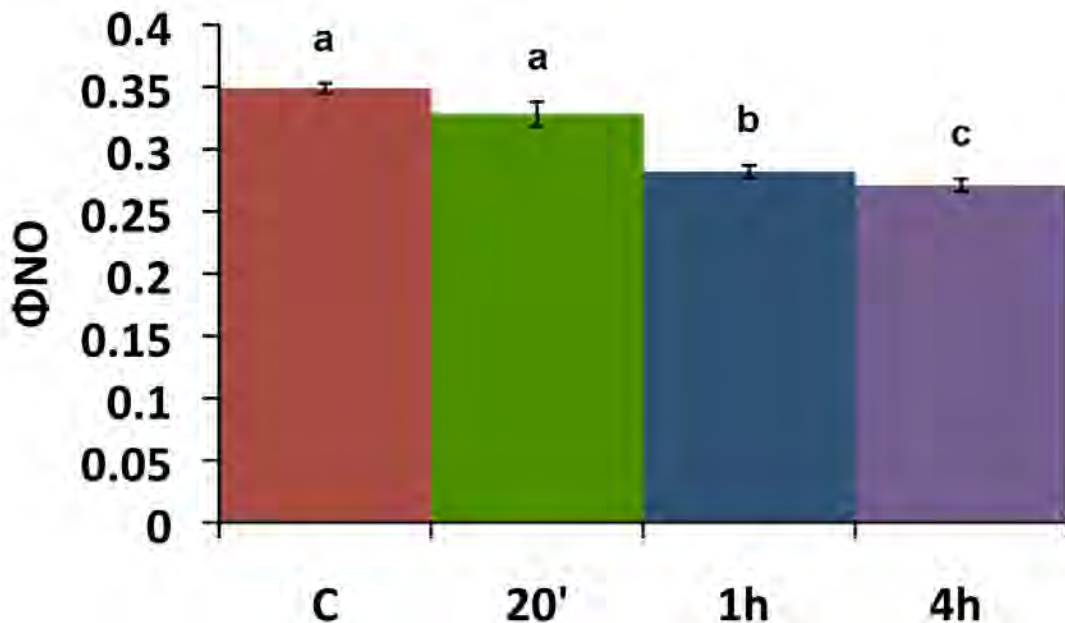
Με την πάροδο του χρόνου από την επίδραση του Pq η απόδοση φωτονίων που χάνεται λόγω μη φωτοχημικής απόσβεσης και οφείλεται στην ελεγχόμενη αποβολή της ενέργειας διέγερσης υπο μορφή θερμότητας (ΦNPQ) αυξήθηκε σταδιακά έως τη 1 ώρα μετά την επίδραση. Πιο συγκεκριμένα **(εικόνα 13)** 20 λεπτά μετά την επίδραση αυξήθηκε 63% ($P < 0.05$), ενώ 1 ώρα μετά η αύξηση



Εικόνα 13. Μεταβολές στο Φ_{NPQ} (απόδοση φωτονίων που χάνονται λόγω μη φωτοχημικής απόσβεσης στο PSII) σε ένταση ακτινοβολίας $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$, σε φύλλα μάρτυρες (control) και μετά από 20 λεπτά, 1 ώρα και 4 ώρες από τον ψεκασμό με Pq των φύλλων του Col-0 ηλικίας τεσσάρων εβδομάδων. Τα δεδομένα είναι μέσοι όροι και τυπικά σφάλματα ($\pm \text{SE}$) από δύο διαφορετικά πειράματα με δύο φύλλα από κάθε μεταχείριση για κάθε πείραμα ($n=4$). Οι τιμές εκφράζουν το μέσο όρο $\pm \text{SE}$ (κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος από πέντε περιοχές ενδιαφέροντος από καθένα από τα τέσσερα φύλλα). Το SE σημειώνεται με μπάρες. Οι τιμές στις στήλες με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά σημαντικά ($P < 0.05$).

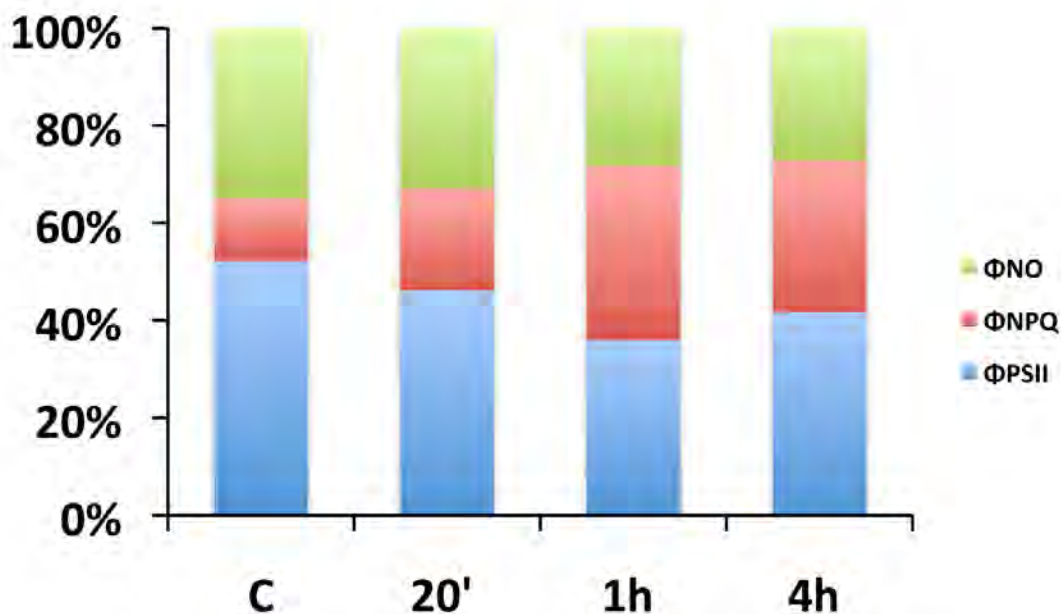
ήταν 179% ($P < 0.001$) συγκριτικά πάντα με τα φυτά μάρτυρες. Ωστόσο, 4 ώρες μετά την επίδραση παρουσίασε μείωση 13% ($P < 0.05$) συγκριτικά με τη 1 ώρα επίδρασης, έτσι ώστε η αύξηση σε σχέση με τα φυτά μάρτυρες ήταν 142% ($P < 0.001$).

Η απόδοση φωτονίων που χάνεται για άλλες μη φωτοχημικές διεργασίες (Φ_{NO}), δηλαδή η μη ελεγχόμενη αποβολή της ενέργειας διέγερσης παρουσίασε συνεχή μείωση με την πάροδο της επίδρασης του Pq (**εικόνα 14**). Μετά από 20 λεπτά μειώθηκε 6% (μη στατιστικά σημαντικά), ενώ 1 ώρα μετά μειώθηκε 19% ($P < 0.001$) και 4 ώρες αργότερα μειώθηκε 22% ($P < 0.001$) σε σύγκριση πάντα με τα φυτά μάρτυρες.



Εικόνα 14. Μεταβολές στο Φ_{NO} (απόδοση φωτονίων που χάνονται για άλλες μη φωτοχημικές διαδικασίες στο PSII) σε ένταση ακτινοβολίας $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$, σε φύλλα μάρτυρες (control) και μετά από 20 λεπτά, 1 ώρα και 4 ώρες από τον ψεκασμό με Pq των φύλλων του *Col-0* ηλικίας τεσσάρων εβδομάδων. Τα δεδομένα είναι μέσοι όροι και τυπικά σφάλματα ($\pm \text{SE}$) από δύο διαφορετικά πειράματα με δύο φύλλα από κάθε μεταχείριση για κάθε πείραμα ($n=4$). Οι τιμές εκφράζουν το μέσο όρο $\pm \text{SE}$ (κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος από πέντε περιοχές ενδιαφέροντος από καθένα από τα τέσσερα φύλλα). Το SE σημειώνεται με μπάρες. Οι τιμές στις στήλες με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά σημαντικά ($P < 0.05$).

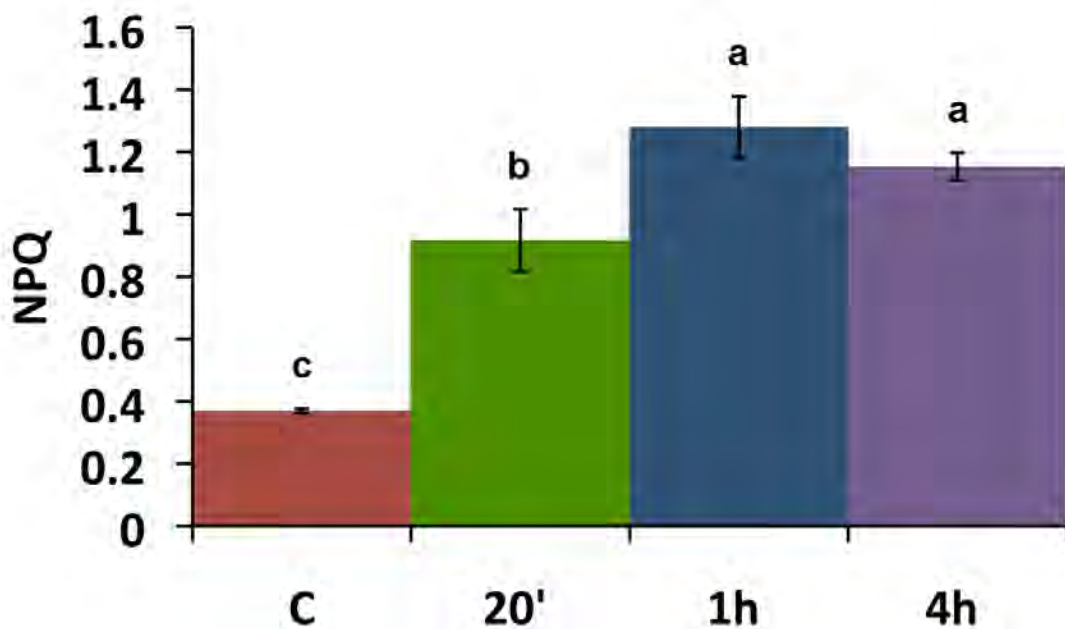
Συνολικά η επίπτωση της επίδρασης του Pq στην κατανομή της ενέργειας του PSII απεικονίζεται στην **εικόνα 15**. Το ποσοστό της ενέργειας που χρησιμοποιείται για φωτοχημεία (ΦPSII) μειώθηκε σταδιακά έως τη 1 ώρα μετά την επίδραση και η μείωση αυτή του ΦPSII συνοδεύτηκε από αύξηση της απόδοσης φωτονίων που χάνεται λόγω μη φωτοχημικής απόσβεσης (ΦNPQ) με ταυτόχρονη όμως μείωση της απόδοσης φωτονίων που χάνεται για άλλες μη φωτοχημικές διεργασίες (ΦNO). Τέσσερις ώρες μετά την επίδραση του Pq σε σύγκριση με τη 1 ώρα, παρατηρήθηκε αύξηση του ΦPSII που συνοδεύτηκε από μείωση του ΦNPQ. Το ποσοστό της αύξησης του ΦPSII ήταν μεγαλύτερο του ποσοστού μείωσης του ΦNPQ και έτσι η απόδοση φωτονίων που χάνεται για άλλες μη φωτοχημικές διεργασίες (ΦNO) παρουσίασε και αυτή μείωση.



Εικόνα 15. Μεταβολές στο Φ_{PSII} (απόδοση φωτονίων στο PSII), Φ_{NPQ} (απόδοση φωτονίων που χάνονται λόγω μη φωτοχημικής απόσβεσης στο PSII) και Φ_{NO} (απόδοση φωτονίων που χάνονται για άλλες μη φωτοχημικές διαδικασίες στο PSII) σε ένταση ακτινοβολίας $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$, σε φύλλα μάρτυρες (control) και μετά από 20 λεπτά, 1 ώρα και 4 ώρες από τον ψεκασμό με Pq των φύλλων του Col-0 ηλικίας τεσσάρων εβδομάδων. Τα δεδομένα είναι μέσοι όροι από δύο διαφορετικά πειράματα με δύο φύλλα από κάθε μεταχείριση για κάθε πείραμα ($n=4$). Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος από πέντε περιοχές ενδιαφέροντος από καθένα από τα τέσσερα φύλλα.

I 2. Επίδραση του Pq στη μη φωτοχημική απόσβεση (NPQ)

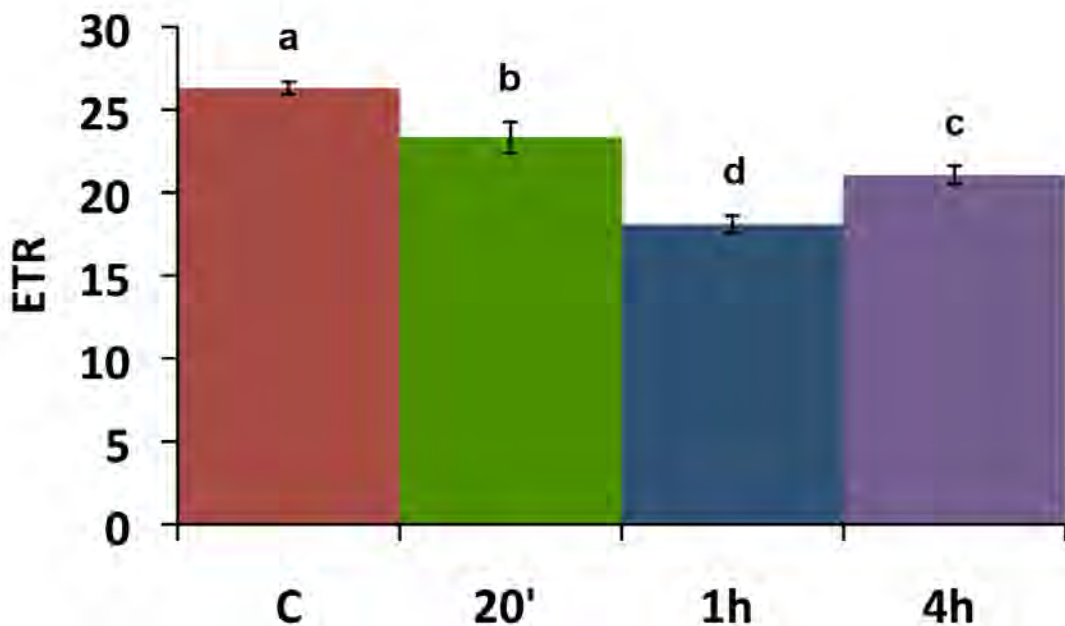
Η παράμετρος NPQ η οποία μετράει τη μη φωτοχημική απόσβεση που αντιπροσωπεύει την αποβολή θερμότητας της ενέργειας διέγερσης στο φωτοσυλλεκτικό σύμπλοκο (αντέννες) αυξήθηκε σταδιακά έως τη 1 ώρα μετά την επίδραση. Πιο αναλυτικά (**εικόνα 16**), 20 λεπτά μετά την επίδραση αυξήθηκε 148% ($P < 0.001$), ενώ 1 ώρα μετά η αύξηση ήταν 246% ($P < 0.001$) συγκριτικά πάντα με τα φυτά μάρτυρες. Ωστόσο, 4 ώρες μετά την επίδραση παρουσίασε μείωση 10% (μη στατιστικά σημαντική) συγκριτικά με τη 1 ώρα επίδρασης, έτσι ώστε η αύξηση σε σχέση με τα φυτά μάρτυρες ήταν 212% ($P < 0.001$).



Εικόνα 16. Μεταβολές στο NPQ (μη φωτοχημική απόσβεση) σε ένταση ακτινοβολίας $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$, σε φύλλα μάρτυρες (control) και μετά από 20 λεπτά, 1 ώρα και 4 ώρες από τον ψεκασμό με Pq των φύλλων του Col-0 ηλικίας τεσσάρων εβδομάδων. Τα δεδομένα είναι μέσοι όροι και τυπικά σφάλματα ($\pm \text{SE}$) από δύο διαφορετικά πειράματα με δύο φύλλα από κάθε μεταχείριση για κάθε πείραμα ($n=4$). Οι τιμές εκφράζουν το μέσο όρο $\pm \text{SE}$ (κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος από πέντε περιοχές ενδιαφέροντος από καθένα από τα τέσσερα φύλλα). Το SE σημειώνεται με μπάρες. Οι τιμές στις στήλες με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά σημαντικά ($P < 0.05$).

Ι 3. Επίδραση του Pq στο ρυθμό μεταφοράς ηλεκτρονίων (ETR) του PSII

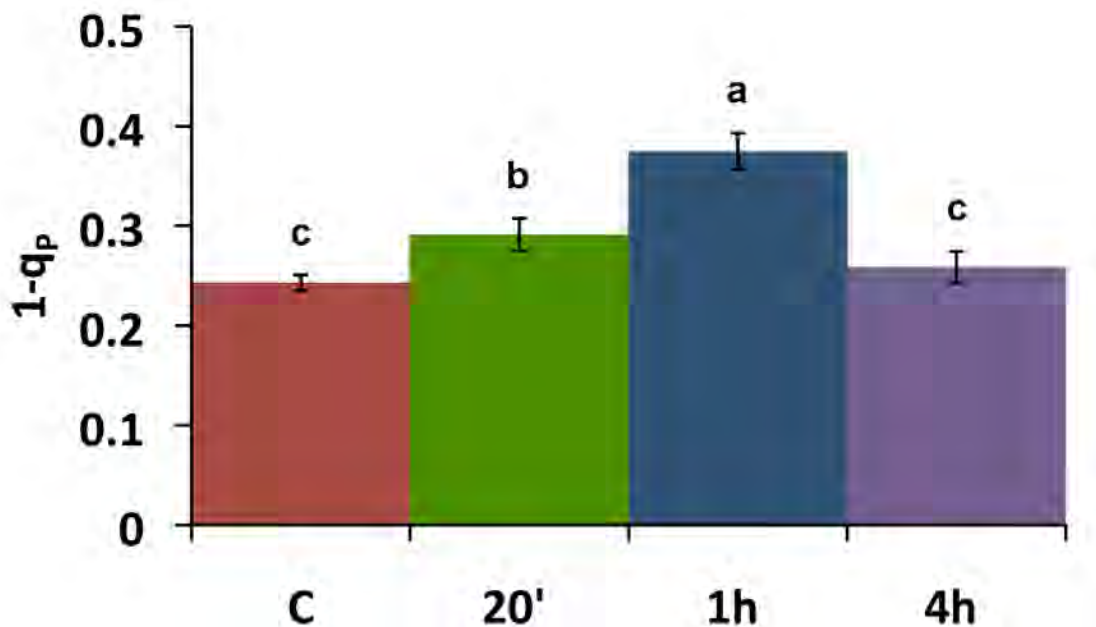
Ο ρυθμός μεταφοράς ηλεκτρονίων (ETR) μειώθηκε σταδιακά έως τη 1 ώρα μετά την επίδραση. Συγκεκριμένα (**εικόνα 17**), 20 λεπτά μετά την επίδραση μειώθηκε 11% ($P < 0.05$), ενώ 1 ώρα μετά η μείωση ήταν 31% ($P < 0.001$) σε σύγκριση με τα φυτά μάρτυρες. Ωστόσο, 4 ώρες μετά την επίδραση παρουσιάστηκε αύξηση 16% ($P < 0.01$) συγκριτικά με τη 1 ώρα επίδρασης, έτσι ώστε η μείωση σε σχέση με τα φυτά μάρτυρες ήταν 20% ($P < 0.001$).



Εικόνα 17. Μεταβολές στο ETR (ρυθμός μεταφοράς ηλεκτρονίων) σε ένταση ακτινοβολίας $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$, σε φύλλα μάρτυρες (control) και μετά από 20 λεπτά, 1 ώρα και 4 ώρες από τον ψεκασμό με Pq των φύλλων του Col-0 ηλικίας τεσσάρων εβδομάδων. Τα δεδομένα είναι μέσοι όροι και τυπικά σφάλματα ($\pm \text{SE}$) από δύο διαφορετικά πειράματα με δύο φύλλα από κάθε μεταχείριση για κάθε πείραμα ($n=4$). Οι τιμές εκφράζουν το μέσο όρο $\pm \text{SE}$ (κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος από πέντε περιοχές ενδιαφέροντος από καθένα από τα τέσσερα φύλλα). Το SE σημειώνεται με μπάρες. Οι τιμές στις στήλες με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά σημαντικά ($P < 0.05$).

Ι 4. Επίδραση του Pq στην πίεση αποδιέγερσης (1-q_p) του PSII

Η πίεση αποδιέγερσης (1-q_p) αυξήθηκε σταδιακά έως τη 1 ώρα μετά την επίδραση. Πιο συγκεκριμένα (**εικόνα 18**), 20 λεπτά μετά την επίδραση αυξήθηκε 20% (P<0.05), ενώ 1 ώρα μετά η αύξηση ήταν 54% (P<0.001) συγκριτικά πάντα με τα φυτά μάρτυρες. Ωστόσο, 4 ώρες μετά την επίδραση παρουσιάστηκε μείωση 31% (P<0.001) συγκριτικά με τη 1 ώρα επίδρασης, έτσι ώστε η αύξηση σε σχέση με τα φυτά μάρτυρες ήταν 6% η οποία όμως δεν ήταν στατιστικά σημαντική.



Εικόνα 18. Μεταβολές στο 1-q_p (πίεση αποδιέγερσης) σε ένταση ακτινοβολίας 120 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$, σε φύλλα μάρτυρες (control) και μετά από 20 λεπτά, 1 ώρα και 4 ώρες από τον ψεκασμό με Pq των φύλλων του Col-0 ηλικίας τεσσάρων εβδομάδων. Τα δεδομένα είναι μέσοι όροι και τυπικά σφάλματα ($\pm\text{SE}$) από δύο διαφορετικά πειράματα με δύο φύλλα από κάθε μεταχείριση για κάθε πείραμα (n=4). Οι τιμές εκφράζουν το μέσο όρο \pm SE (κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος από πέντε περιοχές ενδιαφέροντος από καθένα από τα τέσσερα φύλλα). Το SE σημειώνεται με μπάρες. Οι τιμές στις στήλες με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά σημαντικά (P< 0.05).

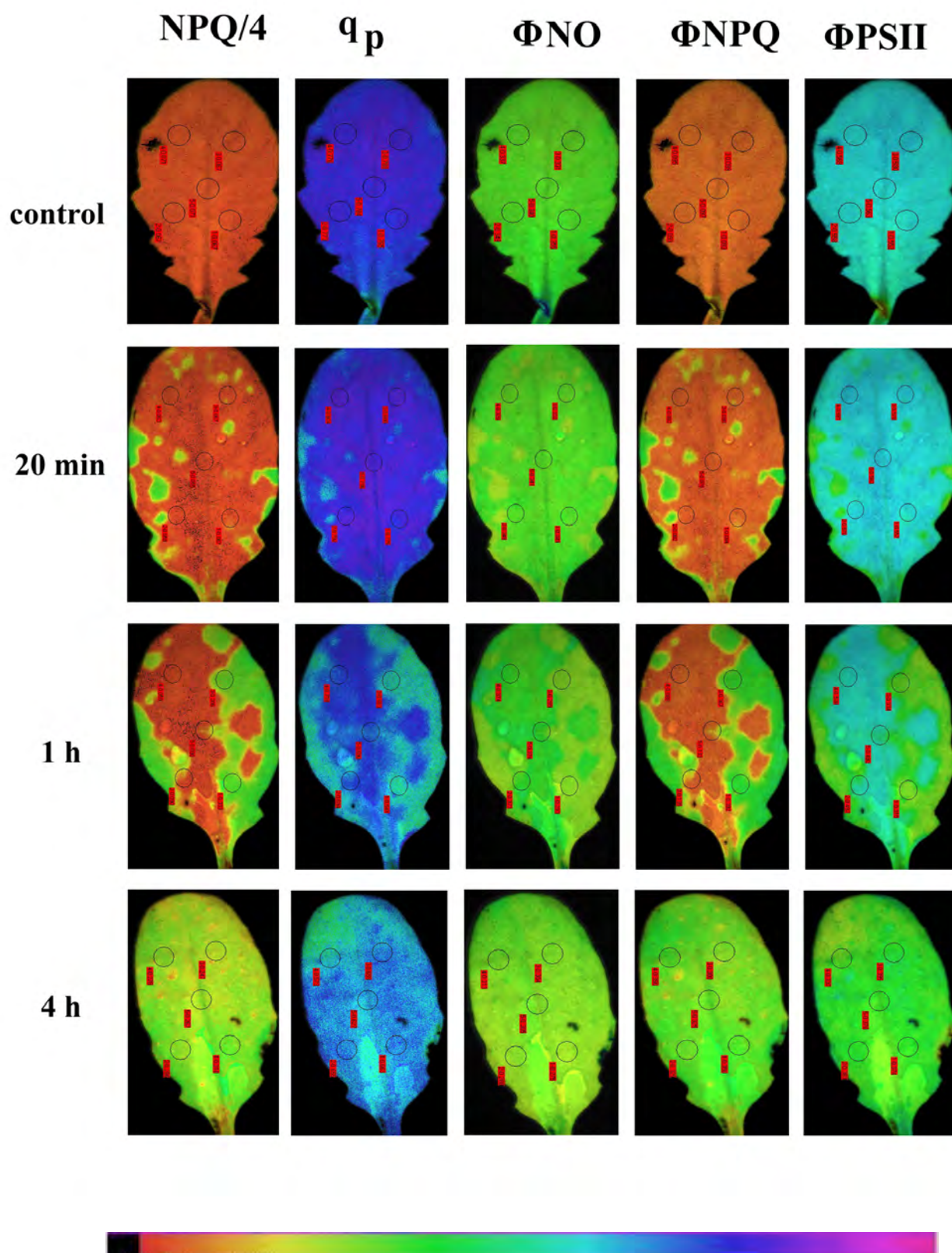
II. Επίδραση του Pq στο μεταλλάγμα *AtHesp* του *Arabidopsis thaliana*

Με τη μέθοδο της απεικόνισης του φθορισμού της χλωροφύλλης μελετήθηκαν επίσης οι επιπτώσεις του Pq στη φωτοσυνθετική απόδοση του μεταλλάγματος *AtHesp* του *Arabidopsis thaliana*. Αντιπροσωπευτικές εικόνες φθορισμού χλωροφύλλης των παραμέτρων της μη φωτοχημικής απόσβεσης (NPQ/4), της φωτοχημικής απόσβεσης (q_P) της απόδοσης φωτονίων που χάνονται για άλλες μη φωτοχημικές διαδικασίες στο PSII (Φ_{NO}), της απόδοσης φωτονίων που χάνονται λόγω μη φωτοχημικής απόσβεσης στο PSII (Φ_{NPQ}) και της απόδοσης φωτονίων στο PSII (Φ_{PSII}) σε ένταση ακτινοβολίας $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$, από φύλλα μάρτυρες (control) και μετά από 20 λεπτά, 1 ώρα και 4 ώρες από τον ψεκασμό με Pq των φύλλων του μεταλλάγματος *AtHesp* του *Arabidopsis thaliana* ηλικίας τεσσάρων εβδομάδων παρουσιάζονται στην **Εικόνα 19**.

II 1. Επίδραση του Pq στην κατανομή ενέργειας του PSII

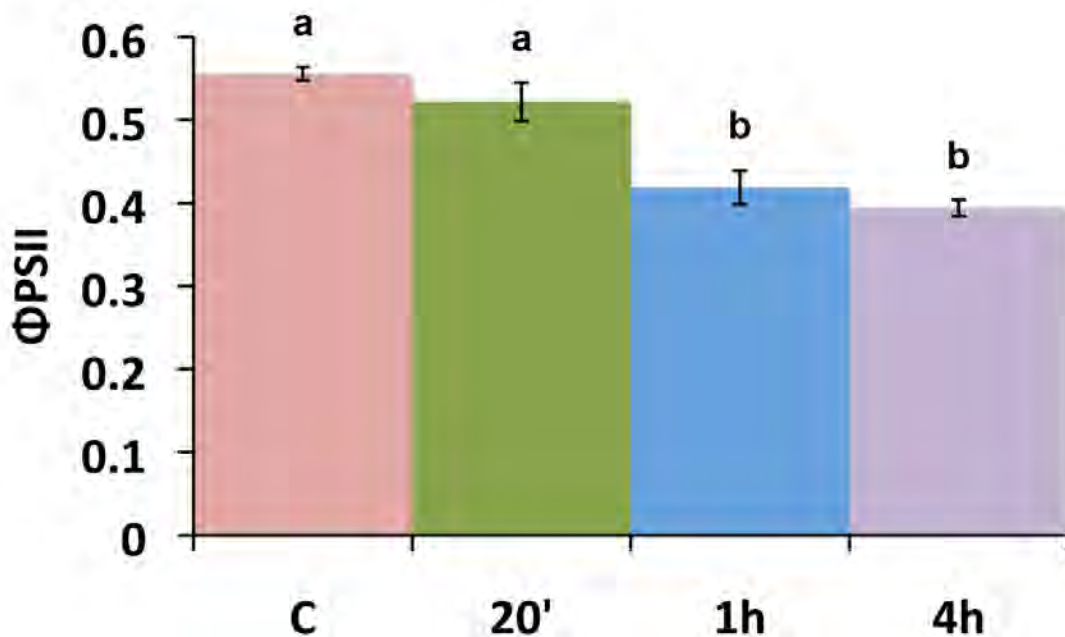
Οι επιπτώσεις 1mM Pq στην απόδοση των φωτονίων του PSII μελετήθηκαν 20 λεπτά, 1 ώρα και 4 ώρες μετά από τον ψεκασμό των φύλλων του μεταλλάγματος *AtHesp*.

Στην **εικόνα 20** φαίνεται ότι η απόδοση φωτονίων του PSII 20 λεπτά μετά τον ψεκασμό μειώθηκε περίπου 6% (όχι στατιστικά σημαντικά), ενώ 1 ώρα μετά παρατηρήθηκε μεγαλύτερη μείωση (20%, $P < 0.05$) συγκριτικά με τα 20 λεπτά και 4 ώρες μετά παρατηρήθηκε περαιτέρω μείωση (29%, $P < 0.001$) συγκριτικά με τα



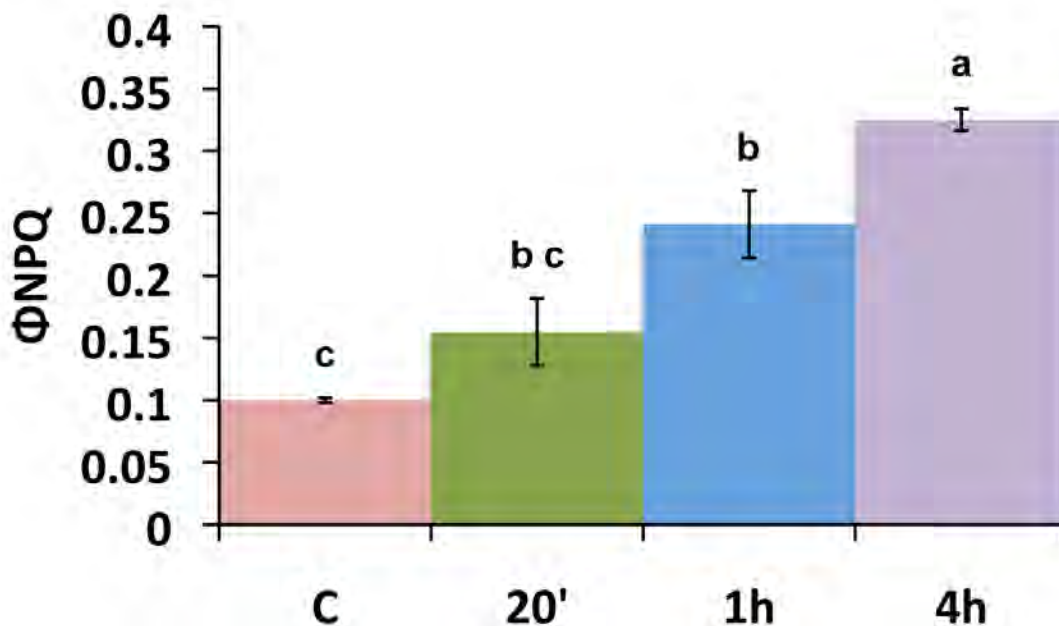
Εικόνα 19: Αντιπροσωπευτικές εικόνες φθορισμού χλωροφύλλης των παραμέτρων NPQ/4, q_p , Φ_{NO} , Φ_{NPQ} και Φ_{PSII} (μετά από 3 min σε ένταση ακτινοβολίας $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$) από φύλλα μάρτυρες (control) και μετά από 20 λεπτά, 1 ώρα και 4 ώρες από τον ψεκασμό με Pq των φύλλων του μεταλλάγματος *AtHesp* του *Arabidopsis thaliana* ηλικίας τεσσάρων εβδομάδων. Η χρωματική κλίμακα στη βάση των εικόνων κυμαίνεται από μαύρο (τιμή εικονοστοιχείου 0.0) μέχρι μωβ (τιμή εικονοστοιχείου 1.0). Οι πέντε κύκλοι σε κάθε εικόνα αντιστοιχούν σε πέντε περιοχές ενδιαφέροντος με τις αντίστοιχες τιμές των παραμέτρων φθορισμού. Στις εικόνες φθορισμού της χλωροφύλλης μετά από τον ψεκασμό με Pq παρουσιάζεται η χωρική ετερογένεια και οι χρονικές μεταβολές μετά από τον ψεκασμό.

φυτά μάρτυρες. Δηλαδή η απόδοση φωτονίων του PSII 4 ώρες μετά τον ψεκασμό παρουσίασε μείωση 6% συγκριτικά με την απόδοση φωτονίων του PSII 1 ώρα μετά τον ψεκασμό η οποία όμως δεν ήταν στατιστικά σημαντική.



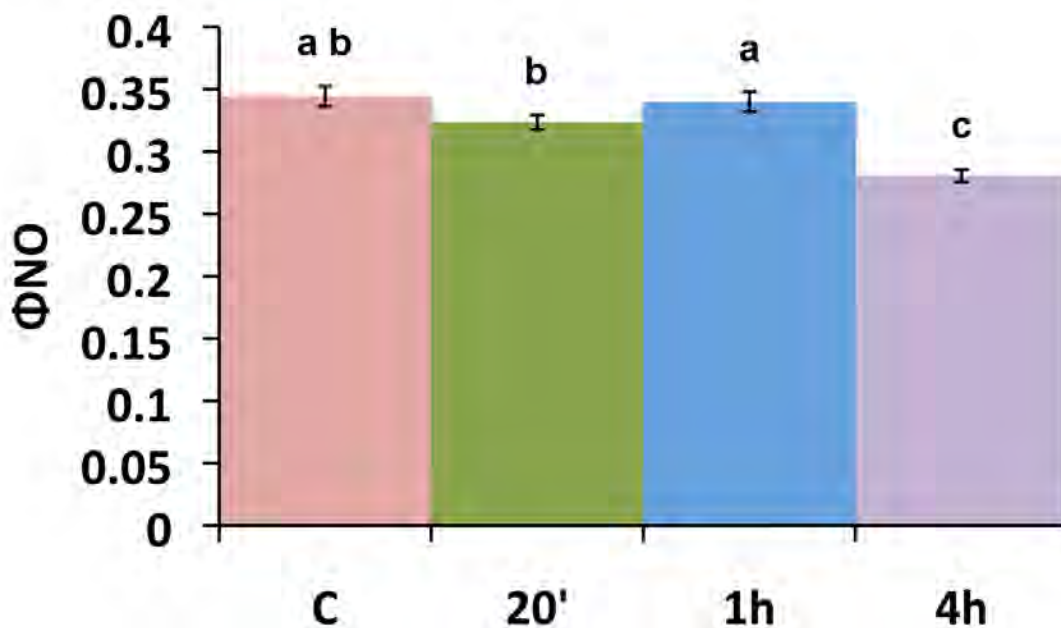
Εικόνα 20. Μεταβολές στο Φ_{PSII} (απόδοση φωτονίων στο PSII), σε ένταση ακτινοβολίας $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$, σε φύλλα μάρτυρες (control) και μετά από 20 λεπτά, 1 ώρα και 4 ώρες από τον ψεκασμό με Pq των φύλλων του μεταλλάγματος *AtHesp* του *Arabidopsis thaliana* ηλικίας τεσσάρων εβδομάδων. Τα δεδομένα είναι μέσοι όροι και τυπικά σφάλματα (\pm SE) από δύο διαφορετικά πειράματα με δύο φύλλα από κάθε μεταχείριση για κάθε πείραμα ($n=4$). Οι τιμές εκφράζουν το μέσο όρο \pm SE (κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος από πέντε περιοχές ενδιαφέροντος από καθένα από τα τέσσερα φύλλα). Το SE σημειώνεται με μπάρες. Οι τιμές στις στήλες με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά σημαντικά ($P<0.05$).

Με την πάροδο του χρόνου της επίδρασης του Pq το Φ_{NPQ} αυξήθηκε σταδιακά. Πιο συγκεκριμένα **(εικόνα 21)** 20 λεπτά μετά την επίδραση αυξήθηκε 54% (μη στατιστικά σημαντικά), ενώ 1 ώρα μετά η αύξηση ήταν 141% ($P<0.01$) συγκριτικά πάντα με τα φυτά μάρτυρες. Το Φ_{NPQ} 4 ώρες μετά την επίδραση παρουσίασε επιπλέον αύξηση 35% ($P<0.01$) συγκριτικά με τη 1 ώρα επίδρασης, έτσι ώστε η αύξηση σε σχέση με τα φυτά μάρτυρες ήταν 225% ($P<0.001$).



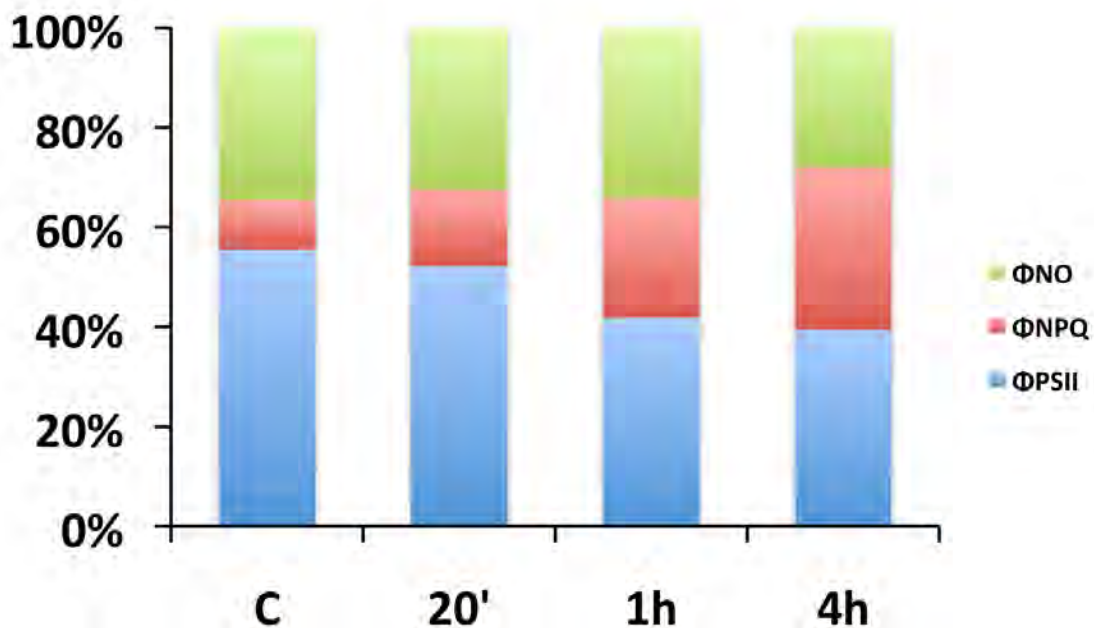
Εικόνα 21. Μεταβολές στο Φ_{NPQ} (απόδοση φωτονίων που χάνονται λόγω μη φωτοχημικής απόσβεσης στο PSII) σε ένταση ακτινοβολίας $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$, σε φύλλα μάρτυρες (control) και μετά από 20 λεπτά, 1 ώρα και 4 ώρες από τον ψεκασμό με Pq των φύλλων του μεταλλάγματος *Athesp* του *Arabidopsis thaliana* ηλικίας τεσσάρων εβδομάδων. Τα δεδομένα είναι μέσοι όροι και τυπικά σφάλματα ($\pm \text{SE}$) από δύο διαφορετικά πειράματα με δύο φύλλα από κάθε μεταχείριση για κάθε πείραμα ($n=4$). Οι τιμές εκφράζουν το μέσο όρο $\pm \text{SE}$ (κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος από πέντε περιοχές ενδιαφέροντος από καθένα από τα τέσσερα φύλλα). Το SE σημειώνεται με μπάρες. Οι τιμές στις στήλες με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά σημαντικά ($P < 0.05$).

Η απόδοση φωτονίων για άλλες μη φωτοχημικές διεργασίες (ΦΝΟ) παρουσίασε αρχικά μείωση (**εικόνα 22**) στα 20 λεπτά επίδρασης 6% (μη στατιστικά σημαντικά), ενώ 1 ώρα μετά αυξήθηκε 5% ($P < 0.05$) σε σχέση με τα 20 λεπτά και ήταν μειωμένη 1% (μη στατιστικά σημαντικά) συγκριτικά με τα φυτά μάρτυρες. Τέσσερις ώρες μετά τον ψεκασμό με Pq το ΦΝΟ παρουσίασε μείωση 17% ($P < 0.001$) σε σχέση με τη 1 ώρα, και 18% ($P < 0.001$) σε σύγκριση με τα φυτά μάρτυρες.



Εικόνα 22. Μεταβολές στο Φ_{No} (απόδοση φωτονίων που χάνονται για άλλες μη φωτοχημικές διαδικασίες στο PSII) σε ένταση ακτινοβολίας $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$, σε φύλλα μάρτυρες (control) και μετά από 20 λεπτά, 1 ώρα και 4 ώρες από τον ψεκασμό με Pq των φύλλων του μεταλλάγματος *AtHesr* του *Arabidopsis thaliana* ηλικίας τεσσάρων εβδομάδων. Τα δεδομένα είναι μέσοι όροι και τυπικά σφάλματα ($\pm \text{SE}$) από δύο διαφορετικά πειράματα με δύο φύλλα από κάθε μεταχείριση για κάθε πείραμα ($n=4$). Οι τιμές εκφράζουν το μέσο όρο $\pm \text{SE}$ (κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος από πέντε περιοχές ενδιαφέροντος από καθένα από τα τέσσερα φύλλα). Το SE σημειώνεται με μπάρες. Οι τιμές στις στήλες με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά σημαντικά ($P < 0.05$).

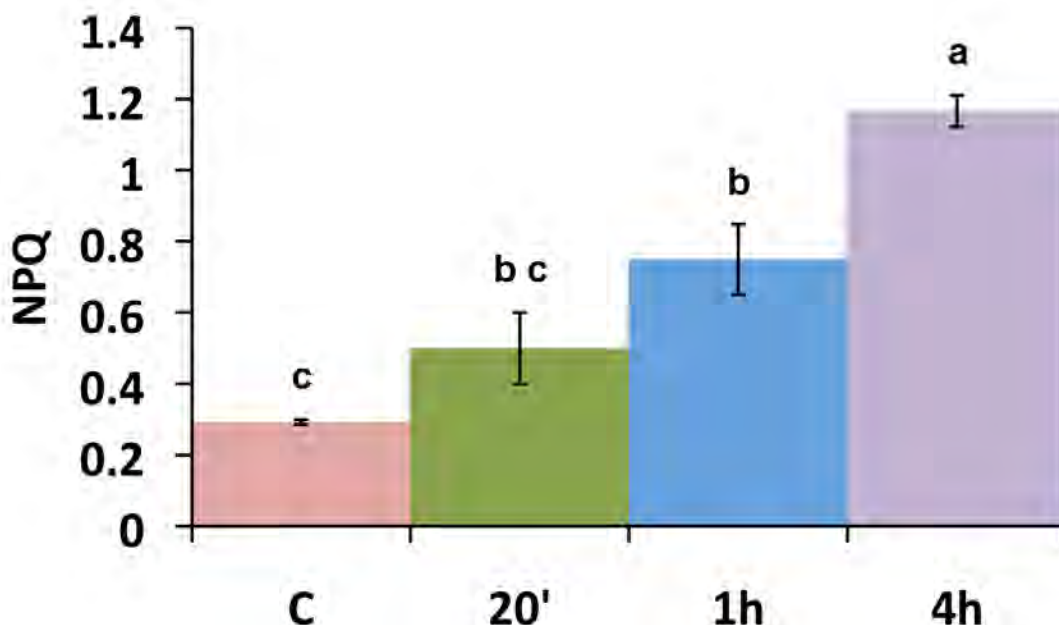
Συνολικά η επίπτωση της επίδρασης του Pq στην κατανομή της ενέργειας του PSII στο μετάλλαγμα *AtHesr* απεικονίζεται στη **εικόνα 23**. Το ποσοστό της ενέργειας που χρησιμοποιείται για φωτοχημεία (ΦPSII) μειώθηκε σταδιακά με την επίδραση του Pq και η μείωση αυτή του ΦPSII συνοδεύτηκε από αύξηση του ΦNPQ. Μετά από 1 ώρα επίδρασης του Pq το ποσοστό της αύξησης του Φ NPQ ήταν λίγο μεγαλύτερο του ποσοστού μείωσης του ΦPSII και έτσι το ΦNO παρουσίασε μικρή μείωση συγκριτικά με τα φυτά μάρτυρες, η οποία όμως αυξήθηκε μετά απο 4 ώρες επίδρασης.



Εικόνα 23. Μεταβολές στο Φ_{PSII} (απόδοση φωτονίων στο PSII), Φ_{NPQ} (απόδοση φωτονίων που χάνονται λόγω μη φωτοχημικής απόσβεσης στο PSII) και Φ_{NO} (απόδοση φωτονίων που χάνονται για άλλες μη φωτοχημικές διαδικασίες στο PSII) σε ένταση ακτινοβολίας $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$, σε φύλλα μάρτυρες (control) και μετά από 20 λεπτά, 1 ώρα και 4 ώρες από τον ψεκασμό με Pq των φύλλων του μεταλλάγματος *AtHesp* του *Arabidopsis thaliana* ηλικίας τεσσάρων εβδομάδων. Τα δεδομένα είναι μέσοι όροι από δύο διαφορετικά πειράματα με δύο φύλλα από κάθε μεταχείριση για κάθε πείραμα ($n=4$). Κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος από πέντε περιοχές ενδιαφέροντος από καθένα από τα τέσσερα φύλλα.

II 2. Επίδραση του Pq στη μη φωτοχημική απόσβεση (NPQ)

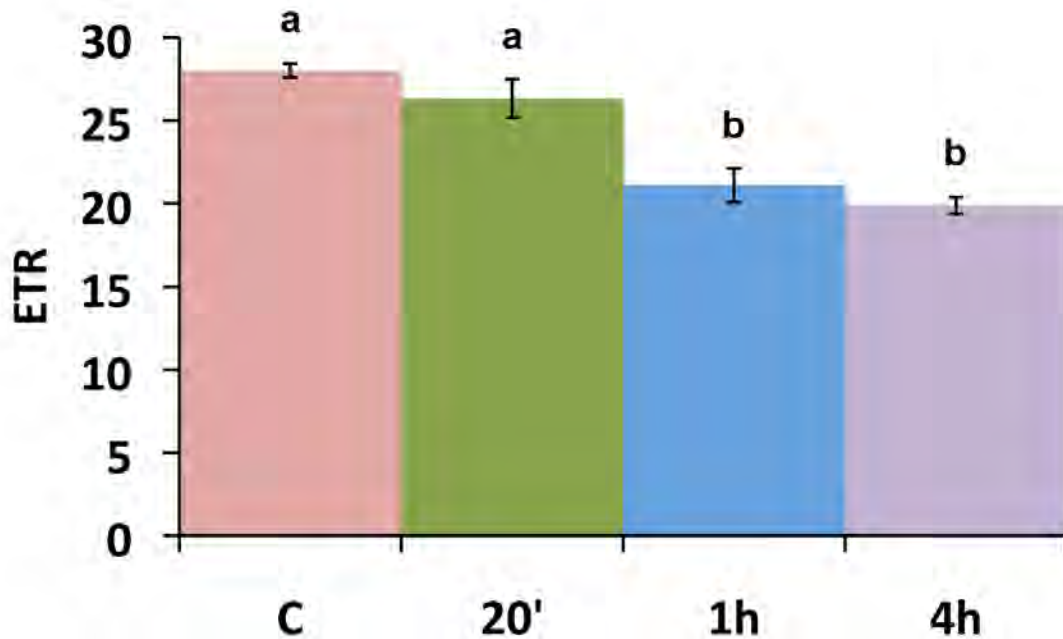
Η παράμετρος NPQ η οποία αντιπροσωπεύει την αποβολή θερμότητας της ενέργειας διέγερσης στο φωτοσυνθετικό σύμπλοκο αυξήθηκε σταδιακά με την πάροδο της επίδρασης του Pq. Πιο αναλυτικά (**εικόνα 24**), 20 λεπτά μετά την επίδραση αυξήθηκε 71% (μη στατιστικά σημαντική), 1 ώρα μετά η αύξηση ήταν 156% ($P<0.01$) και 4 ώρες μετά την επίδραση παρουσίασε αύξηση 299% ($P<0.001$) συγκριτικά με τα φυτά μάρτυρες.



Εικόνα 24. Μεταβολές στο NPQ (μη φωτοχημική απόσβεση) σε ένταση ακτινοβολίας $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$, σε φύλλα μάρτυρες (control) και μετά από 20 λεπτά, 1 ώρα και 4 ώρες από τον ψεκασμό με Pq των φύλλων του μεταλλάγματος *AtHesp* του *Arabidopsis thaliana* ηλικίας τεσσάρων εβδομάδων. Τα δεδομένα είναι μέσοι όροι και τυπικά σφάλματα (\pm SE) από δύο διαφορετικά πειράματα με δύο φύλλα από κάθε μεταχείριση για κάθε πείραμα ($n=4$). Οι τιμές εκφράζουν το μέσο όρο \pm SE (κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος από πέντε περιοχές ενδιαφέροντος από καθένα από τα τέσσερα φύλλα). Το SE σημειώνεται με μπάρες. Οι τιμές στις στήλες με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά σημαντικά ($P < 0.05$).

II 3. Επίδραση του Pq στο ρυθμό μεταφοράς ηλεκτρονίων (ETR) του PSII

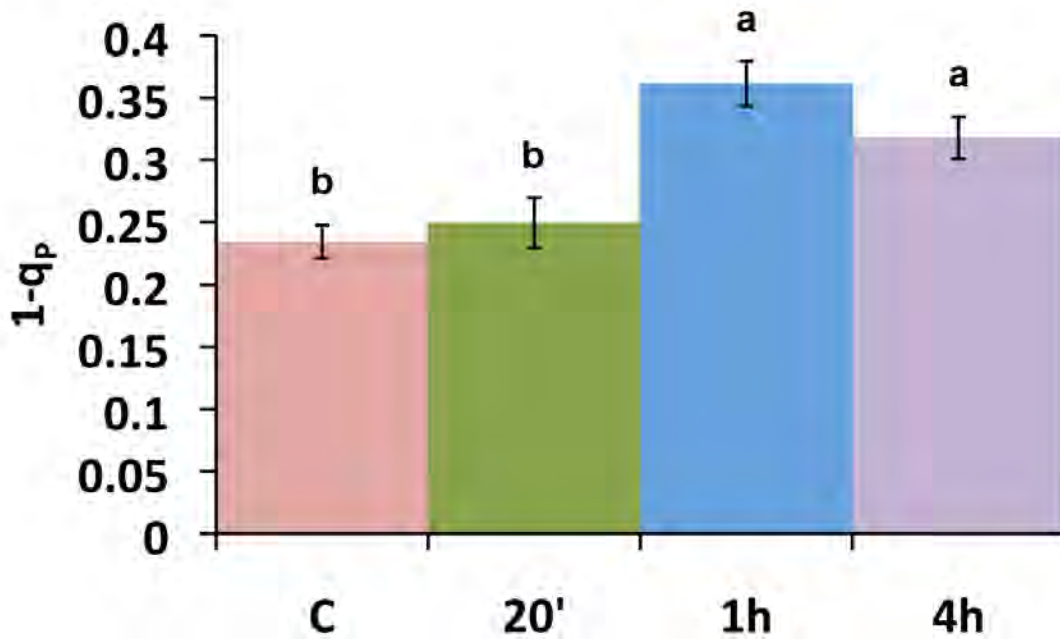
Ο ρυθμός μεταφοράς ηλεκτρονίων (ETR) μειώθηκε σταδιακά με την πάροδο της επίδρασης του Pq. Πιο αναλυτικά (**εικόνα 25**), 20 λεπτά μετά την επίδραση υπήρχε μείωση 6% (μη στατιστικά σημαντική), 1 ώρα μετά η μείωση ήταν 25% ($P < 0.001$) και 4 ώρες μετά την επίδραση παρουσίασε μείωση 29% ($P < 0.001$) συγκριτικά με τα φυτά μάρτυρες. Στις 4 ώρες μετά την επίδραση του Pq η μείωση συγκριτικά με την 1 ώρα ήταν περίπου 6% (μη στατιστικά σημαντική).



Εικόνα 25. Μεταβολές στο *ETR* (ρυθμός μεταφοράς ηλεκτρονίων) σε ένταση ακτινοβολίας $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$, σε φύλλα μάρτυρες (control) και μετά από 20 λεπτά, 1 ώρα και 4 ώρες από τον ψεκασμό με Pq των φύλλων του μεταλλάγματος *AtHesp* του *Arabidopsis thaliana* ηλικίας τεσσάρων εβδομάδων. Τα δεδομένα είναι μέσοι όροι και τυπικά σφάλματα ($\pm\text{SE}$) από δύο διαφορετικά πειράματα με δύο φύλλα από κάθε μεταχείριση για κάθε πείραμα ($n=4$). Οι τιμές εκφράζουν το μέσο όρο $\pm \text{SE}$ (κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος από πέντε περιοχές ενδιαφέροντος από καθένα από τα τέσσερα φύλλα). Το SE σημειώνεται με μπάρες. Οι τιμές στις στήλες με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά σημαντικά ($P < 0.05$).

II 4. Επίδραση του Pq στην πίεση αποδιέγερσης ($1-q_P$) του PSII

Η πίεση αποδιέγερσης ($1 - q_P$) αυξήθηκε σταδιακά έως τη 1 ώρα μετά την επίδραση. Πιο συγκεκριμένα (**εικόνα 26**), 20 λεπτά μετά την επίδραση αυξήθηκε 6% (μη στατιστικά σημαντική), ενώ 1 ώρα μετά η αύξηση ήταν 54% ($P < 0.001$) συγκριτικά πάντα με τα φυτά μάρτυρες. Ωστόσο, 4 ώρες μετά την επίδραση παρουσιάστηκε μείωση 12% (μη στατιστικά σημαντική) συγκριτικά με τη 1 ώρα επίδρασης, έτσι ώστε η αύξηση σε σχέση με τα φυτά μάρτυρες ήταν 35% ($P < 0.01$).



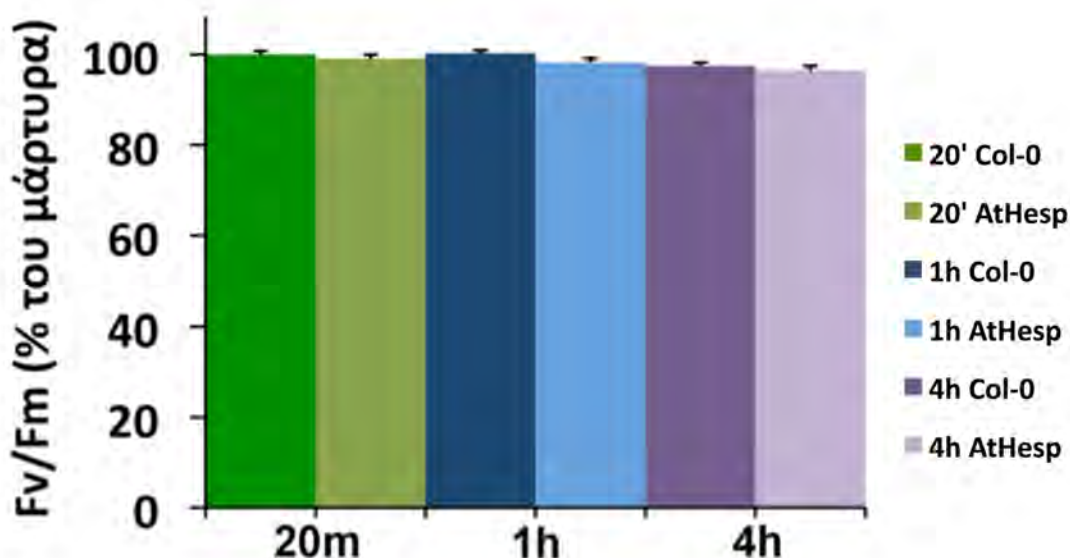
Εικόνα 26. Μεταβολές στο $1-q_P$ (πίεση αποδιέγερσης) σε ένταση ακτινοβολίας $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$, σε φύλλα μάρτυρες (control) και μετά από 20 λεπτά, 1 ώρα και 4 ώρες από τον ψεκασμό με Pq των φύλλων του μεταλλάγματος *AtHesp* του *Arabidopsis thaliana* ηλικίας τεσσάρων εβδομάδων. Τα δεδομένα είναι μέσοι όροι και τυπικά σφάλματα (\pm SE) από δύο διαφορετικά πειράματα με δύο φύλλα από κάθε μεταχείριση για κάθε πείραμα ($n=4$). Οι τιμές εκφράζουν το μέσο όρο \pm SE (κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος από πέντε περιοχές ενδιαφέροντος από καθένα από τα τέσσερα φύλλα). Το SE σημειώνεται με μπάρες. Οι τιμές στις στήλες με διαφορετικά γράμματα διαφέρουν στατιστικά σημαντικά ($P < 0.05$).

III. Σύγκριση των επιπτώσεων του Pq στον οικότυπο Col-0 και στο μετάλλαγμα *AtHesp*

Πραγματοποιήθηκε συγκριτική μελέτη των παραμέτρων του φθορισμού της χλωροφύλλης σε φυτά μάρτυρες μεταξύ του Col-0 και του *AtHesp* καθώς και σε φυτά μετά από 20 λεπτά, 1 ώρα και 4 ώρες από την επίδραση του Pq, μεταξύ του Col-0 και του *AtHesp* του *Arabidopsis thaliana*.

III 1. Σύγκριση της επίδρασης του Pq στη μέγιστη απόδοση φωτονίων (F_v/F_m) του PSII

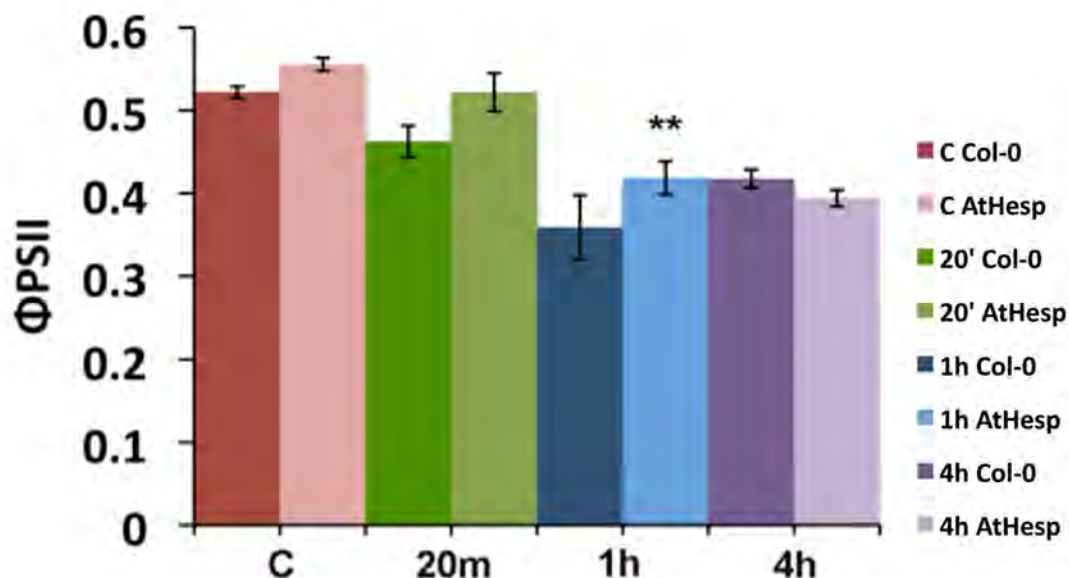
Η εκατοστιαία μεταβολή της μέγιστης απόδοσης φωτονίων του Col-0 και του *AtHesp* του *Arabidopsis thaliana* μετά από 20 λεπτά, 1 ώρα και 4 ώρες από την επίδραση του Pq συγκριτικά με τα αντίστοιχα φυτά μάρτυρες παρουσίασε μικρή μείωση η οποία όμως δεν ήταν στατιστικά σημαντική **(εικόνα 27)**. Μικρή αύξηση της μέγιστης απόδοσης φωτονίων παρουσίασαν τα φυτά Col-0 μετά από 1 ώρα επίδρασης του Pq, συγκριτικά με τα φυτά μάρτυρες, όσο και με τα φυτά μετά από 20 λεπτά από την επίδραση του Pq, η οποία όμως δεν ήταν επίσης στατιστικά σημαντική **(εικόνα 27)**.



Εικόνα 27. Εκατοστιαία σύγκριση με τα φύλλα μάρτυρες (control) των μεταβολών του F_v/F_m (μέγιστη απόδοση φωτονίων στο PSII), μετά από 20 λεπτά, 1 ώρα και 4 ώρες από τον ψεκασμό με Pq του Col 0 και του μεταλλάγματος *AtHesp* του *Arabidopsis thaliana* ηλικίας τεσσάρων εβδομάδων. Τα δεδομένα είναι μέσοι όροι και τυπικά σφάλματα (\pm SE) από δύο διαφορετικά πειράματα με δύο φύλλα από κάθε μεταχείριση για κάθε πείραμα ($n=4$). Οι τιμές εκφράζουν το μέσο όρο \pm SE (κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος από πέντε περιοχές ενδιαφέροντος από καθένα από τα τέσσερα φύλλα). Το SE σημειώνεται με μπάρες.

III 2. Σύγκριση της επίδρασης του Pq στην κατανομή ενέργειας του PSII

Η απόδοση φωτονίων του PSII (ΦPSII) στα φυτά μάρτυρες ήταν αυξημένη στο μετάλλαγμα *AtHesp* συγκριτικά με τον οικότυπο Col-0 (**εικόνα 28**) και παρέμεινε υψηλότερη και μετά την επίδραση του Pq στα 20 λεπτά και στη 1 ώρα ($P<0.01$). Ωστόσο 4 ώρες μετά τον ψεκασμό παρατηρήθηκε ανάκαμψη στην απόδοση φωτονίων του PSII στα φυτά Col-0 η οποία ήταν και αυξημένη συγκριτικά με τα φυτά του μεταλλάγματος.

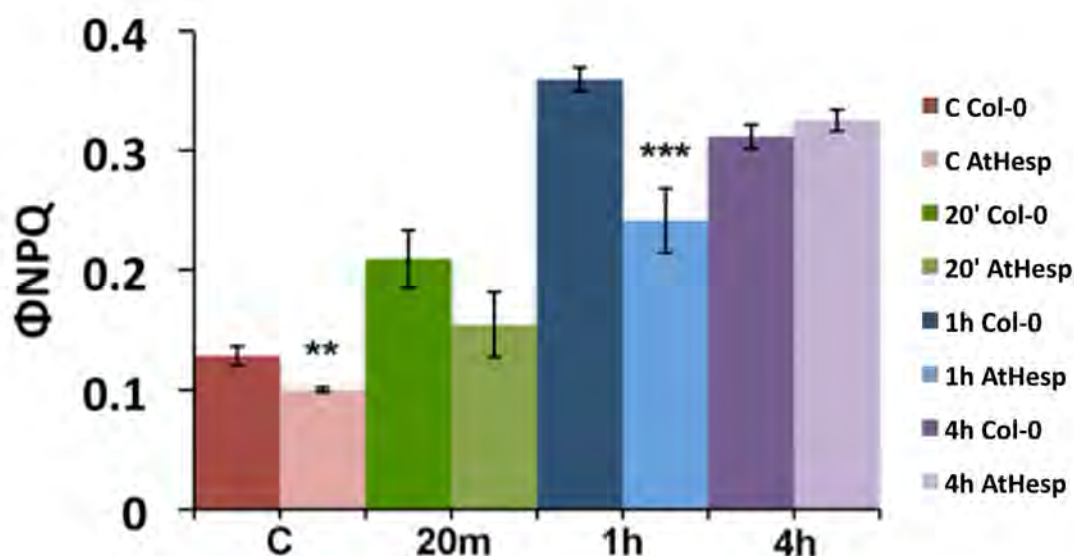


Εικόνα 28. Σύγκριση των μεταβολών του Φ_{PSII} (απόδοση φωτονίων στο PSII), σε ένταση ακτινοβολίας $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$, σε φύλλα μάρτυρες (control) και μετά από 20 λεπτά, 1 ώρα και 4 ώρες από τον ψεκασμό με Pq του Col 0 και του μεταλλάγματος *AtHesp* του *Arabidopsis thaliana* ηλικίας τεσσάρων εβδομάδων. Τα δεδομένα είναι μέσοι όροι και τυπικά σφάλματα (\pm SE) από δύο διαφορετικά πειράματα με δύο φύλλα από κάθε μεταχείριση για κάθε πείραμα ($n=4$). Οι τιμές εκφράζουν το μέσο όρο \pm SE (κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος από πέντε περιοχές ενδιαφέροντος από καθένα από τα τέσσερα φύλλα). Το SE σημειώνεται με μπάρες. Δύο αστερίσκοι δηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των φύλλων του Col 0 και του μεταλλάγματος *AtHesp* της ίδιας μεταχείρισης ($P < 0.01$).

Η απόδοση φωτονίων που χάνεται λόγω μη φωτοχημικής απόσβεσης και οφείλεται στην ελεγχόμενη αποβολή της ενέργειας διέγερσης υπό μορφή θερμότητας (ΦNPQ) αυξήθηκε σταδιακά έως τη 1 ώρα μετά την επίδραση τόσο στα Col-0 όσο και στα μεταλλάγματα, αλλά 4 ώρες μετά παρουσίασε μείωση στο Col-0 αλλά περαιτέρω αύξηση στο *AtHesp* (εικόνα 29).

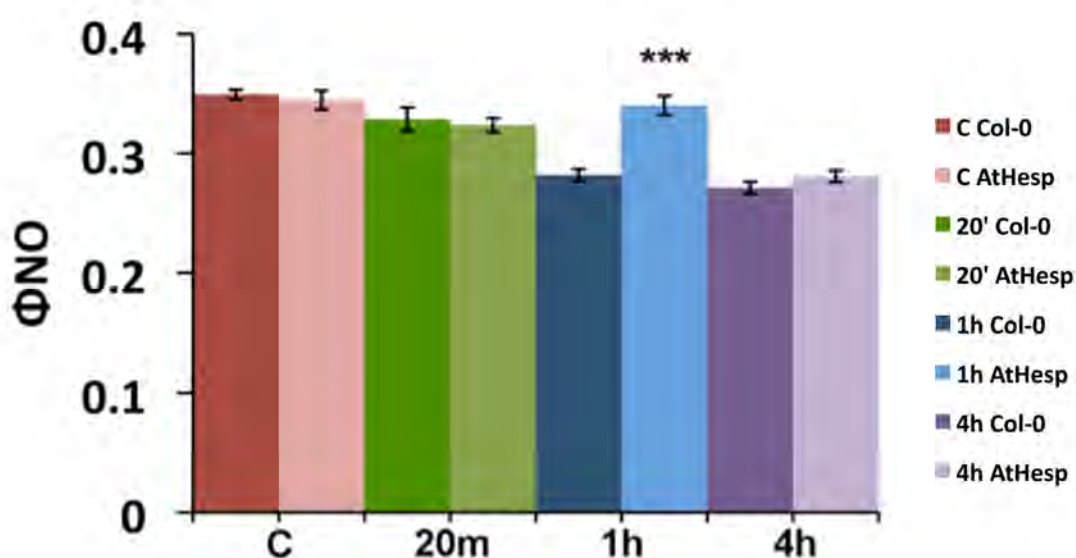
Τόσο στα φυτά μάρτυρες όσο και 1 ώρα μετά την επίδραση του Pq το ΦNPQ ήταν στατιστικά σημαντικά ($P < 0.01$ και $P < 0.001$ αντίστοιχα) αυξημένο στα φυτά του οικότυπου Col-0 σε σχέση με του μεταλλάγματος. Ωστόσο 4 ώρες μετά την επίδραση το ΦNPQ ήταν μειωμένο στα φυτά του αγρίου τύπου τόσο συγκριτικά με τα φυτά του μεταλλάγματος όσο και τα αντίστοιχα Col-0

μετά από 1 ώρα επίδρασης του Pq, αλλά παρέμεινε αυξημένο σε σχέση με τα Col-0 φυτά μάρτυρες και τα Col-0 μετά από επίδραση 20 λεπτών .



Εικόνα 29. Σύγκριση των μεταβολών του Φ_{NPQ} (απόδοση φωτονίων που χάνονται λόγω μη φωτοχημικής απόσβεσης στο PSII), σε ένταση ακτινοβολίας $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$, σε φύλλα μάρτυρες (control) και μετά από 20 λεπτά, 1 ώρα και 4 ώρες από τον ψεκασμό με Pq του Col 0 και του μεταλλάγματος *AtHesp* του *Arabidopsis thaliana* ηλικίας τεσσάρων εβδομάδων. Τα δεδομένα είναι μέσοι όροι και τυπικά σφάλματα (\pm SE) από δύο διαφορετικά πειράματα με δύο φύλλα από κάθε μεταχείριση για κάθε πείραμα ($n=4$). Οι τιμές εκφράζουν το μέσο όρο \pm SE (κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος από πέντε περιοχές ενδιαφέροντος από καθένα από τα τέσσερα φύλλα). Το SE σημειώνεται με μπάρες. Ένας αστερίσκος δηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των φύλλων του Col 0 και του μεταλλάγματος *AtHesp* της ίδιας μεταχείρισης ($P < 0.05$), δύο αστερίσκοι ($P < 0.01$), τρεις αστερίσκοι ($P < 0.001$).

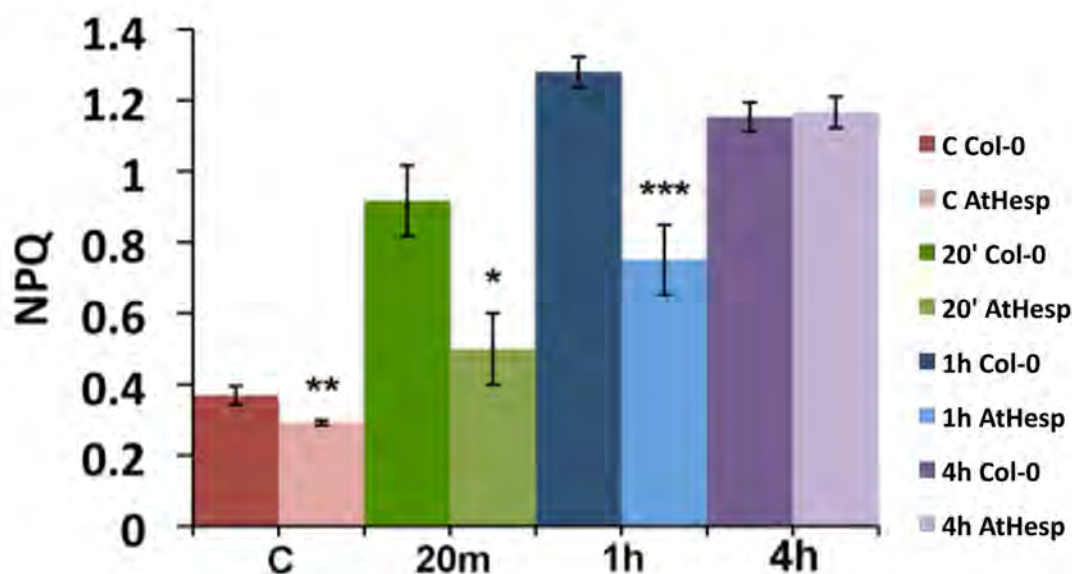
Η μη ελεγχόμενη αποβολή της ενέργειας διέγερσης (ΦΝΟ) παρουσίασε μείωση μετά την επίδραση του Pq τόσο στο μετάλλαγμα όσο και στο Col-0 (εικόνα 30). Στα φυτά Col-0 η μείωση ήταν συνεχής ως και τις 4 ώρες μετά την επίδραση ενώ στα φυτά του μεταλλάγματος υπήρξε μείωση ως τα 20 λεπτά και αύξηση στη 1 ώρα επίδρασης αλλά 4 ώρες μετά συνεχίστηκε η μείωση. Επίσης δεν παρουσίασε σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο εκτός από τη 1 ώρα μετά την επίδραση που ήταν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη ($P < 0.001$) στο μετάλλαγμα (εικόνα 30).



Εικόνα 30. Σύγκριση των μεταβολών του Φ_{NPQ} (απόδοση φωτονίων που χάνονται λόγω μη φωτοχημικής απόσβεσης στο PSII), σε ένταση ακτινοβολίας $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$, σε φύλλα μάρτυρες (control) και μετά από 20 λεπτά, 1 ώρα και 4 ώρες από τον ψεκασμό με Pq του Col 0 και του μεταλλάγματος *AtHesp* του *Arabidopsis thaliana* ηλικίας τεσσάρων εβδομάδων. Τα δεδομένα είναι μέσοι όροι και τυπικά σφάλματα ($\pm \text{SE}$) από δύο διαφορετικά πειράματα με δύο φύλλα από κάθε μεταχείριση για κάθε πείραμα ($n=4$). Οι τιμές εκφράζουν το μέσο όρο $\pm \text{SE}$ (κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος από πέντε περιοχές ενδιαφέροντος από καθένα από τα τέσσερα φύλλα). Το SE σημειώνεται με μπάρες. Τρεις αστερίσκοι δείχνουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των φύλλων του Col 0 και του μεταλλάγματος *AtHesp* της ίδιας μεταχείρισης ($P < 0.001$).

III 3. Σύγκριση της επίδρασης του Pq στη μη φωτοχημική απόσβεση (NPQ)

Η μη φωτοχημική απόσβεση (NPQ) αυξήθηκε σταδιακά τόσο στα φυτά αγρίου τύπου όσο και στο μετάλλαγμα έως τη 1 ώρα μετά την επίδραση. Συγκεκριμένα (**εικόνα 31**), τα φυτά Col-0 παρουσιάζουν αυξημένο NPQ σε σχέση με το μετάλλαγμα *AtHesp* στα φυτά μάρτυρες ($P < 0.01$), μετά από 20 λεπτά επίδρασης ($P < 0.05$) αλλά και μετά από 1 ώρα επίδρασης ($P < 0.001$). Μετά από 4 ώρες επίδρασης του Pq τα φυτά Col-0 παρουσίασαν μείωση της μη

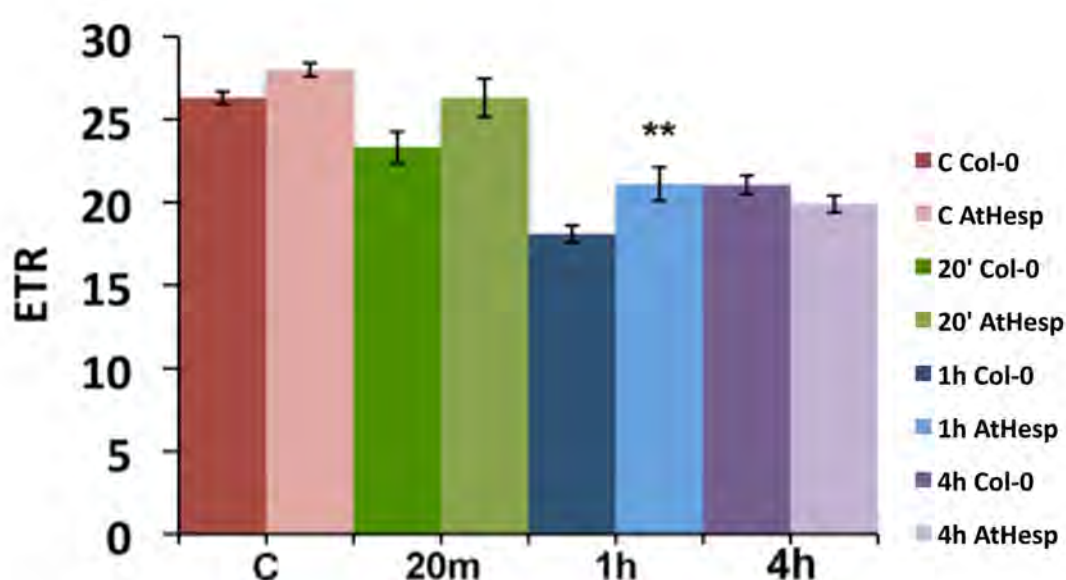


Εικόνα 31. Σύγκριση των μεταβολών του NPQ (μη φωτοχημική απόσβεση), σε ένταση ακτινοβολίας $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$, σε φύλλα μάρτυρες (control) και μετά από 20 λεπτά, 1 ώρα και 4 ώρες από τον ψεκασμό με Pq του Col 0 και του μεταλλάγματος *AtHesp* του *Arabidopsis thaliana* ηλικίας τεσσάρων εβδομάδων. Τα δεδομένα είναι μέσοι όροι και τυπικά σφάλματα ($\pm \text{SE}$) από δύο διαφορετικά πειράματα με δύο φύλλα από κάθε μεταχείριση για κάθε πείραμα ($n=4$). Οι τιμές εκφράζουν το μέσο όρο $\pm \text{SE}$ (κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος από πέντε περιοχές ενδιαφέροντος από καθένα από τα τέσσερα φύλλα). Το SE σημειώνεται με μπάρες. Ένας αστερίσκος δηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των φύλλων του Col 0 και του μεταλλάγματος *AtHesp* της ίδιας μεταχείρισης ($P < 0.05$), δύο αστερίσκοι ($P < 0.01$), τρεις αστερίσκοι ($P < 0.001$).

φωτοχημικής απόσβεσης τόσο σε σχέση με αυτά της 1 ώρας όσο και με αυτά του μεταλλάγματος.

III 4. Σύγκριση της επίδρασης του Pq στο ρυθμό μεταφοράς ηλεκτρονίων (ETR) του PSII

Ο ρυθμός μεταφοράς ηλεκτρονίων (ETR) μειώθηκε σταδιακά στα μεταλλάγματα αλλά και στα φυτά αγρίου τύπου έως μια ώρα μετά την επίδραση (εικόνα 32).

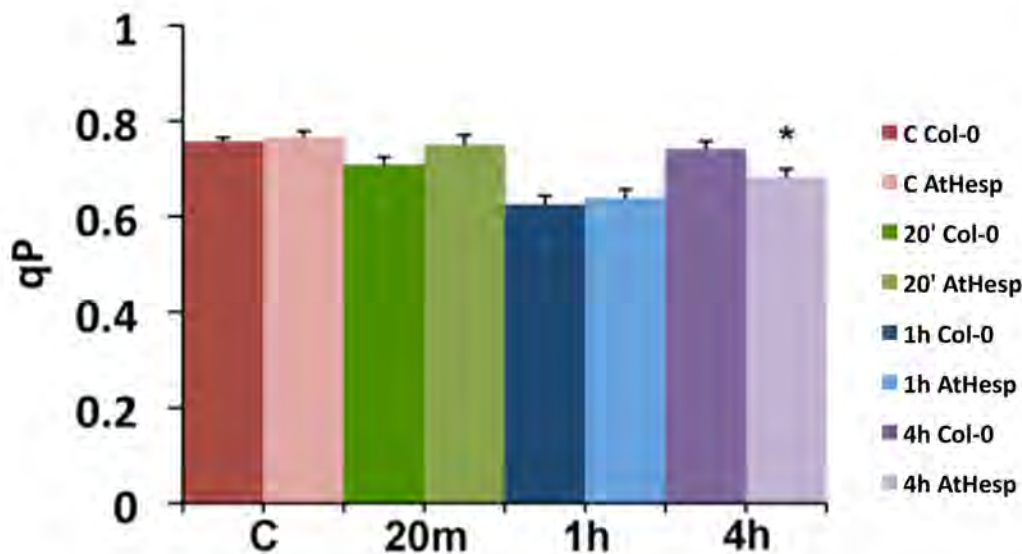


Εικόνα 32. Σύγκριση των μεταβολών του ETR (ρυθμός μεταφοράς ηλεκτρονίων), σε ένταση ακτινοβολίας $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$, σε φύλλα μάρτυρες (control) και μετά από 20 λεπτά, 1 ώρα και 4 ώρες από τον ψεκασμό με Pq του Col 0 και του μεταλλάγματος *AtHesp* του *Arabidopsis thaliana* ηλικίας τεσσάρων εβδομάδων. Τα δεδομένα είναι μέσοι όροι και τυπικά σφάλματα (\pm SE) από δύο διαφορετικά πειράματα με δύο φύλλα από κάθε μεταχείριση για κάθε πείραμα ($n=4$). Οι τιμές εκφράζουν το μέσο όρο \pm SE (κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος από πέντε περιοχές ενδιαφέροντος από καθένα από τα τέσσερα φύλλα). Το SE σημειώνεται με μπάρες. Δύο αστερίσκοι δείχνουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των φύλλων του Col 0 και του μεταλλάγματος *AtHesp* της ίδιας μεταχείρισης ($P < 0.01$).

Σε σύγκριση μεταξύ των δύο φαίνεται πως το μετάλλαγμα *AtHesp* εμφανίζει μεγαλύτερο ETR έως και 1 ώρα μετά την επίδραση του Pq ($P < 0.01$). Τέσσερις ώρες μετά την επίδραση το μετάλλαγμα συνεχίζει να παρουσιάζει μείωση ενώ αντίθετα το Col-0 παρουσίασε αύξηση εμφανίζοντας έτσι μεγαλύτερο ρυθμό μεταφοράς ηλεκτρονίων σε σχέση με το μετάλλαγμα.

III 5. Σύγκριση της επίδρασης του Pq στη φωτοχημική απόσβεση (q_p)

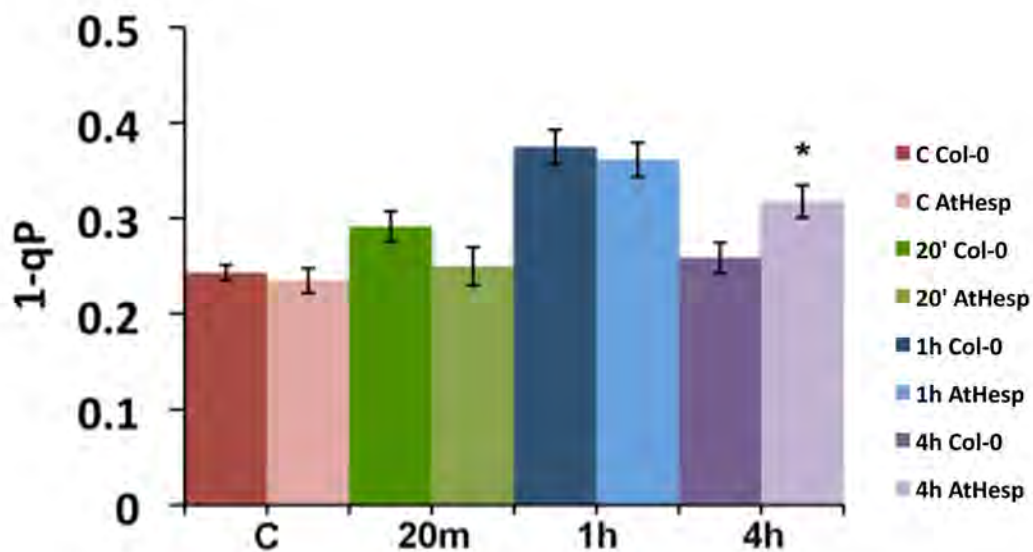
Η φωτοχημική απόσβεση, q_p είναι ένα μέτρο του μέρους των ανοιχτών κέντρων αντίδρασης του PSII, και εκτιμά την σχετική κατάσταση αναγωγής της QA, της πρώτης σταθερής κινόνης η οποία είναι δέκτης ηλεκτρονίων στο PSII. Η οξειδωτική κατάσταση της κινόνης QA μειώθηκε έως 1 ώρα μετά την επίδραση του Pq τόσο στα φυτά αγρίου τύπου όσο και του μεταλλάγματος συγκριτικά με τα αντίστοιχα φυτά μάρτυρες, δηλαδή υπήρξε μείωση των ανοιχτών κέντρων αντίδρασης του PSII (**εικόνα 33**). Ωστόσο 4 ώρες μετά την επίδραση του Pq τα φυτά Col-0 αλλά και τα *AtHesp* παρουσίασαν αύξηση των ανοιχτών κέντρων αντίδρασης του PSII συγκριτικά με αυτά της 1 ώρας, με τα φυτά Col-0 να παρουσιάζουν σημαντικά ($P < 0.05$) μεγαλύτερο αριθμό ανοιχτών κέντρων αντίδρασης του PSII συγκριτικά με του μεταλλάγματος *AtHesp*.



Εικόνα 33. Σύγκριση των μεταβολών του q_P (φωτοχημική απόσβεση), σε ένταση ακτινοβολίας $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$, σε φύλλα μάρτυρες (control) και μετά από 20 λεπτά, 1 ώρα και 4 ώρες από τον ψεκασμό με Pq του Col 0 και του μεταλλάγματος *AtHesp* του *Arabidopsis thaliana* ηλικίας τεσσάρων εβδομάδων. Τα δεδομένα είναι μέσοι όροι και τυπικά σφάλματα (\pm SE) από δύο διαφορετικά πειράματα με δύο φύλλα από κάθε μεταχείριση για κάθε πείραμα ($n=4$). Οι τιμές εκφράζουν το μέσο όρο \pm SE (κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος από πέντε περιοχές ενδιαφέροντος από καθένα από τα τέσσερα φύλλα). Το SE σημειώνεται με μπάρες. Ένας αστερίσκος δηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των φύλλων του Col 0 και του μεταλλάγματος *AtHesp* της ίδιας μεταχείρισης ($P < 0.05$).

III 6. Σύγκριση της επίδρασης του Pq στην πίεση αποδιέγερσης του PSII

Η πίεση αποδιέγερσης ($1 - q_P$) αυξήθηκε σταδιακά έως 1 ώρα μετά την επίδραση του Pq και ήταν αυξημένη στα φυτά αγρίου τύπου σε σχέση με αυτά του μεταλλάγματος (**εικόνα 34**). Στις 4 ώρες μετά την επίδραση του Pq τα φυτά Col-0 αλλά και τα *AtHesp* παρουσίασαν μεγάλη μείωση συγκριτικά με αυτά της 1 ώρας αλλά στη μεταξύ τους σύγκριση τα μεταλλάγματα τα *AtHesp* παρουσίασαν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη πίεση αποδιέγερσης από τα Col-0.



Εικόνα 34. Σύγκριση των μεταβολών του 1-qP (πίεση αποδιέγερσης), σε ένταση ακτινοβολίας $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$, σε φύλλα μάρτυρες (control) και μετά από 20 λεπτά, 1 ώρα και 4 ώρες από τον ψεκασμό με Pq του Col 0 και του μεταλλάγματος *AtHesp* του *Arabidopsis thaliana* ηλικίας τεσσάρων εβδομάδων. Τα δεδομένα είναι μέσοι όροι και τυπικά σφάλματα ($\pm\text{SE}$) από δύο διαφορετικά πειράματα με δύο φύλλα από κάθε μεταχείριση για κάθε πείραμα ($n=4$). Οι τιμές εκφράζουν το μέσο όρο $\pm \text{SE}$ (κάθε τιμή είναι ο μέσος όρος από πέντε περιοχές ενδιαφέροντος από καθένα από τα τέσσερα φύλλα). Το SE σημειώνεται με μπάρες. Ένας αστερίσκος δηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των φύλλων του Col 0 και του μεταλλάγματος *AtHesp* της ίδιας μεταχείρισης ($P < 0.05$).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

I. Η φωτοχημική απόδοση του οικότυπου Col-0 και του μεταλλάγματος *AtHesp* του *Arabidopsis thaliana* σε φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης

Σε φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης η απόδοση φωτονίων του φωτοσυστήματος II (ΦPSII) του μεταλλάγματος *AtHesp* ήταν μεγαλύτερη συγκριτικά με του Col-0. Επίσης το μετάλλαγμα *AtHesp* παρουσίασε ταυτόχρονα σημαντική ($P < 0.01$) μείωση της αποβολής ενέργειας διέγερσης υπό τη μορφή θερμότητας (ΦNPQ) η οποία συνοδεύτηκε επίσης από μειωμένη μη ελεγχόμενη αποβολή της ενέργειας διέγερσης (ΦNO), συγκριτικά με τον οικότυπο Col-0. Επομένως σε φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης η κατανομή της ενέργειας του PSII ήταν καλύτερη στο μετάλλαγμα *AtHesp*. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα το μετάλλαγμα να έχει μικρότερη πίεση αποδιέγερσης ($1-q_P$). Το μετάλλαγμα *AtHesp* παρουσίασε αυξημένο ρυθμό μεταφοράς ηλεκτρονίων (ETR) σε σχέση με το Col-0, γεγονός που είχε σαν αποτέλεσμα να εμφανίσει μεγαλύτερο ποσοστό ανοικτών κέντρων αντίδρασης (q_P), δηλαδή πιο οξειδωμένη κατάσταση της κινόνης A (Q_A). Ταυτόχρονα παρουσίασε σημαντικά ($P < 0.01$) μειωμένη μη φωτοχημική απόσβεση (NPQ) συγκριτικά με το Col-0.

Επομένως σε φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης η κατανομή της ενέργειας του PSII ήταν καλύτερη στο μετάλλαγμα *AtHesp*.

II. Η φωτοχημική απόδοση του οικότυπου Col-0 και του μεταλλάγματος *AtHesp* του *Arabidopsis thaliana* υπό την επίδραση του Pq

Το Pq είναι ένα τύπου διπυριδινίου ζιζανιοκτόνο το οποίο παρεμβαίνει στη μεταφορά ηλεκτρονίων στο PSI λαμβάνοντας τα ηλεκτρόνια αντί της φερεδοξίνης (Fd) σχηματίζοντας ρίζες διπυριδινίου (Moskova et al. 2009). Αυτές οι ρίζες διπυριδινίου ανάγουν το O_2 και παράγουν υπεροξειδικές ρίζες ($O_2^{\cdot-}$) (Moskova et al. 2009). Η υπεροξειδική ρίζα δε θεωρείται από τις ισχυρές μορφές ROS, αλλά οι χλωροπλάστες προσπαθούν να απαλλαγούν από τις υπεροξειδικές ρίζες μόλις αυτές δημιουργούνται μέσω της υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD), η οποία τις μετατρέπει σε υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) και O_2 (Gould 2003). Στους χλωροπλάστες η βιταμίνη E (α-τοκοφερόλη) και η βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ) είναι αποτελεσματικές μη ενζυμικές αντιοξειδωτικές ενώσεις για την απάλειψη της $O_2^{\cdot-}$.

Η $O_2^{\cdot-}$ είναι ικανή και για οξειδωση και για αναγωγή και αντιδρά με μερικά οργανικά μόρια αλλά διαχέεται πολύ αργά και δε μπορεί να διαπεράσει τις κυτταρικές μεμβράνες, σε αντίθεση το H_2O_2 είναι πιο τοξικό και διαχέεται γρήγορα εντός και μεταξύ των κυττάρων διαπερνώντας τις λιπιδικές μεμβράνες γρηγορότερα απ' ό,τι με απλή διάχυση (Gould 2003). Το H_2O_2 απενεργοποιεί θεμελιώδη ένζυμα του κύκλου του Calvin, και οξειδώνοντας τις θειολικές ομάδες, διαταράσσει το μηχανισμό της αφομοίωσης του άνθρακα. Γι' αυτό το λόγο οι χλωροπλάστες προσπαθούν να απαλλαγούν και από το H_2O_2 κυρίως μέσω του ενζυμικού αντιοξειδωτικού μηχανισμού τους με τις καταλάσες (CAT) ή τις υπεροξειδάσες (POD). Οι CAT βρίσκονται κυρίως στα υπεροξειδιοσώματα και δευτερευόντως στα μιτοχόνδρια. Στους

χλωροπλάστες η ασκορβική υπεροξειδάση (APX) είναι το κύριο ένζυμο για την απάλειψη του H_2O_2 .

Οι χλωροπλάστες θέλουν να απαλλαγούν επίσης από την $O_2^{\cdot -}$ και το H_2O_2 γιατί οι δύο αυτές μορφές μπορούν να αντιδράσουν μεταξύ τους και να προκύψει O_2 , OH^{\cdot} και OH^- μέσω της αντίδρασης Haber Weiss. Το OH^{\cdot} θεωρείται η περισσότερο ενεργή μορφή των ROS που δύσκολα μπορεί να εξαλειφθεί και γι' αυτό το λόγο τα φυτά προσπαθούν να απομακρύνουν την $O_2^{\cdot -}$ και το H_2O_2 .

Το Pq αναστέλλει την αφομοίωση του CO_2 στα φυτά αλλά η κύρια ζιζανιοκτόνος δράση του οφείλεται στη δημιουργία των ROS (Harvey and Fraser 1980), με επακόλουθο την καταστροφή των βιομεμβρανών (Farrington et al. 1973). Οι διπλοί δεσμοί των ακόρεστων λιπαρών οξέων των βιομεμβρανών είναι οι κύριοι στόχοι των ROS με επακόλουθο την υπεροξειδωση των λιπιδίων και άμεση συνέπεια την απώλεια της διαπερατότητας των μεμβρανών και την καταστροφή τους (Szigetti et al. 2001).

Η δράση του Pq τόσο στο Col-0 όσο και στο μετάλλαγμα ήταν εμφανής ήδη 20 λεπτά μετά την επίδραση, όπου για την αποφυγή δημιουργίας ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS), μείωσαν την απόδοση φωτονίων του φωτοσυστήματος II (ΦPSII) με παράλληλη αύξηση του ΦNPQ, τόση ώστε να μην υπάρξει αύξηση του ΦNO, αλλά να παρατηρηθεί μικρή μείωση του. Ωστόσο η μείωση του ΦPSII στο μετάλλαγμα ήταν μικρότερη και συνοδεύτηκε από μικρότερη αύξηση του ΦNPQ η οποία διατήρησε το ΦNO σε τιμές μικρότερες από αυτές του μάρτυρα. Δηλαδή μετά από 20 λεπτά επίδρασης του Pq η κατανομή της ενέργειας του PSII ήταν καλύτερη στο μετάλλαγμα

AtHesp. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα το μετάλλαγμα να έχει μικρότερη πίεση αποδιέγερσης ($1-q_P$). Το *AtHesp* παρουσίασε αυξημένο ρυθμό μεταφοράς ηλεκτρονίων (ETR) σε σχέση με το Col-0, γεγονός που είχε σαν αποτέλεσμα να εμφανίσει μεγαλύτερο ποσοστό ανοικτών κέντρων αντίδρασης (q_P) δηλαδή πιο οξειδωμένη κατάσταση της κινόνης A (Q_A) με ταυτόχρονη σημαντικά μειωμένη ($P<0.05$) μη φωτοχημική απόσβεση (NPQ) συγκριτικά με το Col-0.

Η αύξηση της μη φωτοχημικής απόσβεσης (NPQ) σε συνθήκες στρες είναι ένας μηχανισμός που έχει σαν συνέπεια την αποφυγή δημιουργίας ROS, με ταυτόχρονη ρύθμιση της μείωση του Φ PSII (Neubauer and Yamamoto 1992, Schreiber et al. 1995). Αυτό επιτυγχάνεται με την ενεργοποίηση του κύκλου MAP (Mehler-Ascorbate-Peroxidase) (Asada and Badger 1984, Asada and Takahashi 1987) η όπως αλλιώς ονομάζεται "κύκλος του νερού" ("water-water cycle") (Asada 1999).

Είκοσι λεπτά μετά τον ψεκασμό με Pq στο μετάλλαγμα δε χρειάστηκε η ενεργοποίηση του φωτοπροστατευτικού μηχανισμού του NPQ για την προστασία του έναντι των ROS, τόσο όσο στο Col-0, γιατί πιθανόν διέθετε αυξημένο αντιοξειδωτικό ή ενζυμικό μηχανισμό. Επιπλέον, η επαγωγή του φωτοπροστατευτικού μηχανισμού του "κύκλου του νερού" στο Col-0 φαίνεται ότι δεν ήταν αρκετά επαρκής για την προστασία του από το οξειδωτικό στρες καθώς παρουσίασε σημαντικά μειωμένο ποσοστό ανοιχτών κέντρων αντίδρασης συγκριτικά με τα φυτά μάρτυρες.

Μετά από 1 ώρα επίδρασης του Pq υπήρξε περαιτέρω μείωση του ΦPSII τόσο στο Col-0 όσο και στο *AtHesp* με παράλληλη αύξηση του ΦNPQ. Η μείωση του ΦPSII στο *AtHesp* ήταν μικρότερη, με αποτέλεσμα το ΦPSII στο μετάλλαγμα να είναι σημαντικά ($P<0.01$) μεγαλύτερο του Col-0 και να

παρουσιάσει σημαντικά ($P < 0.001$) μικρότερο Φ NPQ αλλά να διατηρήσει ταυτόχρονα σημαντικά ($P < 0.001$) μεγαλύτερο ΦNO από το Col-0. Μετά από 1 ώρα επίδρασης το μετάλλαγμα είχε μικρότερη πίεση αποδιέγερσης ($1-q_p$) και παρουσίασε σημαντικά ($P < 0.01$) μεγαλύτερο ρυθμό μεταφοράς ηλεκτρονίων (ETR), σε σχέση με το Col-0, γεγονός που είχε σαν αποτέλεσμα να εμφανίσει μεγαλύτερο ποσοστό ανοικτών κέντρων αντίδρασης (q_p) έχοντας σημαντικά μειωμένο ($P < 0.001$) NPQ συγκριτικά με το Col-0. Επομένως, μετά από 1 ώρα επίδρασης Pq, ενώ το μετάλλαγμα φαίνεται να έχει σημαντικά μεγαλύτερο ΦPSII ($P < 0.01$) σε σχέση με το Col-0, παρουσιάζει ταυτόχρονα σημαντικά αυξημένη ($P < 0.001$) μη ελεγχόμενη αποβολή της ενέργειας διέγερσης (ΦNO), η οποία όμως παραμένει στα επίπεδα του *AtHesp* του μάρτυρα.

Η σημαντική αύξηση της μη φωτοχημικής απόσβεσης (NPQ) σε συνθήκες στρες έχει σαν σκοπό την αποφυγή δημιουργίας ROS (Hideg et al. 2008, Schreiber and Klughammer 2008). Το Col-0 μετά από 1 ώρα επίδρασης Pq, αύξησε ουσιαστικά το NPQ που διατηρήθηκε σημαντικά ($P < 0.001$) μεγαλύτερο από ότι στο μετάλλαγμα, με αποτέλεσμα να διατηρήσει σημαντικά ($P < 0.001$) μειωμένη μη ελεγχόμενη αποβολή της ενέργειας διέγερσης (ΦNO), για την αποφυγή δημιουργίας ROS. Η αυξημένη μη φωτοχημική απόσβεση (NPQ) απενεργοποιεί την διεγερμένη χλωροφύλλη (Havaux et al. 2007), αποφεύγοντας έτσι την παραγωγή 1O_2 . Το γεγονός αυτό μπορεί να βοηθήσει στην αποφυγή της φωτοαναστολής σε συνθήκες στρες (Triantaphylidès et al. 2008).

Μία ώρα μετά την επίδραση του Pq, τόσο το Col-0 όσο και το *AtHesp*, παρουσίασαν σημαντικά μειωμένο ποσοστό ανοικτών κέντρων αντίδρασης συγκριτικά με τα φυτά μάρτυρες. Δηλαδή μία ώρα μετά την επίδραση του Pq

οι φωτοπροστατευτικοί μηχανισμοί φαίνεται ότι δεν ήταν αρκετά επαρκείς για την προστασία τους από το οξειδωτικό στρες.

Τέσσερις ώρες μετά την επίδραση του Pq η εικόνα φαίνεται να αλλάζει, και να αρχίζει να εμφανίζεται ανάκαμψη, κυρίως στο Col-0, το οποίο παρουσιάζει αυξημένο Φ PSII σε σχέση με το Col-0 μετά από 1 ώρα επίδρασης. Παράλληλα, το Φ PSII του μεταλλάγματος 4 ώρες μετά την επίδραση, παρουσιάζει μείωση με το αντίστοιχο της 1 ώρας και διατηρείται μικρότερο από το Col-0 των 4 ωρών μετά την επίδραση. Ταυτόχρονα, το FNPQ και το FNO του Col-0 διατηρούνται μικρότερα από ό,τι του μεταλλάγματος. Τέσσερις ώρες μετά την επίδραση, το Col-0 είχε σημαντικά μικρότερη ($P < 0.05$) πίεση αποδιέγερσης ($1 - q_P$) και παρουσίασε αυξημένο ρυθμό μεταφοράς ηλεκτρονίων (ETR) σε σχέση με το μετάλλαγμα, γεγονός που είχε σαν αποτέλεσμα να εμφανίσει σημαντικά μεγαλύτερο ($P < 0.05$) ποσοστό ανοικτών κέντρων αντίδρασης (q_P). Επομένως, 4 ώρες μετά την επίδραση Pq, το Col-0 παρουσίασε ανάκαμψη με σημαντικά αυξημένο ($P < 0.01$) Φ PSII, σημαντικά μειωμένο ($P < 0.05$) FNPQ και σημαντικά μειωμένο ($P < 0.05$) FNO σε σχέση με τη 1 ώρα επίδρασης. Επίσης, η πίεση αποδιέγερσης του Col-0, 4 ώρες μετά την επίδραση ήταν σημαντικά μειωμένη ($P < 0.001$) συγκριτικά με τη 1 ώρα, χωρίς να παρουσιάζεται σημαντικά αυξημένη συγκριτικά με τα φυτά Col-0 μάρτυρες. Παράλληλα υπήρξε σημαντική αύξηση ($P < 0.01$) του ETR συγκριτικά με τη 1 ώρα. Επομένως 4 ώρες μετά την επίδραση του Pq, εμφανίστηκε στο Col-0 μεγαλύτερη ανάκαμψη συγκριτικά με το μετάλλαγμα *AtHesp*.

III. Χωρο-χρονική μεταβολή της φωτοχημικής απόδοσης του οικότυπου Col-0 και του μεταλλάγματος *AtHesp* του *Arabidopsis thaliana* υπό την επίδραση του Pq

Πολλές παράμετροι φθορισμού της χλωροφύλλης, όπως η απόδοση φωτονίων στο φωτοσύστημα II (Φ_{PSII}) και η μη-φωτοχημική απόσβεση (NPQ) έχουν χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση της χωρικής ετερογένειας στην απόκριση στο αβιοτικό στρες (Osmond et al. 1999, Omasa and Takayama 2003, Walter et al. 2004). Μία απεικόνιση του NPQ δείχνει την κατανομή της ενδοθυλακοειδούς διαβάθμισης pH και την ικανότητα των χλωροπλαστών να αποβάλλουν την περίσσεια ενέργεια ως θερμότητα (Krause and Weiss 1991, Osmond et al. 1998). Για το λόγο αυτό, οι απεικονίσεις του NPQ έχουν χρησιμοποιηθεί ως δείκτες για την ετερογένεια των στομάτων, καθώς η αποβολή της θερμότητας εξαρτάται από το κλείσιμό τους (Daley et al. 1989, Osmond et al. 1998, Omasa and Takayama 2003). Οι απεικονίσεις του Φ_{PSII} δείχνουν την κατανομή της απόδοσης της μη κυκλικής μεταφοράς ηλεκτρονίων του φωτοσυστήματος II (PSII) (Genty and Meyer 1995, Bro et al. 1996).

Σε γενικές γραμμές, οι μειώσεις στην απόδοση φωτονίων του PSII (Φ_{PSII}) στα περιθώρια των φύλλων σε σχέση με το κεντρικό τμήμα τους (**εικόνα 11**) ενδέχεται να προέκυψαν και από τη φωτοπροστατευτική αύξηση της αποβολής θερμικής ενέργειας, που προκαλείται από την περίσσεια του απορροφούμενου φωτός (Demmig-Adams and Adams 1992). Αυτό φαίνεται από την αύξηση του NPQ στα περιθώρια των φύλλων σε σχέση με το κεντρικό τμήμα και αποτελεί ένδειξη ότι υπήρχε μεγαλύτερος περιορισμός της

φωτοσύνθεσης και μεγαλύτερη ανάγκη προστατευτικής ικανότητας της μη φωτοχημικής απόσβεσης (**εικόνα 11**).

Η ανεπαρκής αποβολή της περίσσειας ενέργειας είναι πιθανό να επιφέρει φωτοοξειδωτικό στρες, το οποίο προκαλείται από την περίσσεια ηλεκτρονίων στις φωτεινές αντιδράσεις της φωτοσύνθεσης, με αποτέλεσμα την παραγωγή ROS (Smirnoff 1993, Rennenberg et al. 2006, Posch and Bennett 2009).

Οι μετρήσεις του φθορισμού της χλωροφύλλης είναι γρήγορες και οικονομικές. Ωστόσο, όπως προκύπτει από τα αποτελέσματά μας, η βλάβη που προκαλείται από την επίδραση του Pq δεν παρουσιάζεται ομοιογενώς σε ολόκληρη την περιοχή του φύλλου, με αποτέλεσμα οι μετρήσεις σε ένα μικρό σημείο της επιφάνειάς του να υπόκεινται σε σφάλματα (Sperdouli and Moustakas 2012). Η απεικόνιση του φθορισμού της χλωροφύλλης είναι ένα ιδιαίτερα χρήσιμο εργαλείο για τη μελέτη των μεταβολών της φωτοσυνθετικής απόδοσης των φύλλων του *A. thaliana* μετά την επίδραση Pq, καθώς προσφέρει μία χωρική ανάλυση και μπορεί γρήγορα να ποσοτικοποιήσει τη βλάβη που προκαλείται από την επίδραση του Pq. Οι απεικονίσεις του φθορισμού της χλωροφύλλης έδειξαν ξεκάθαρα τη χωρική και χρονική ετερογένεια των παραμέτρων φθορισμού της χλωροφύλλης που προκαλούνται από την επίδραση του Pq και έδωσαν περαιτέρω πληροφορίες για τις περιοχές του φύλλου που υπέστησαν μεγαλύτερη επίδραση από την μεταχείριση με Pq. Εικόνες με χρωματική κλίμακα της κατανομής του Φ_{PSII} πάνω στο φύλλο του *Arabidopsis* έδειξαν ότι οι μικρότερες τιμές του Φ_{PSII} από την επίδραση του Pq εμφανίστηκαν πιο άμεσα στα περιθώρια των φύλλων σε σχέση με το κεντρικό τμήμα του φύλλου, με ταυτόχρονη μεγαλύτερη αύξηση

του Φ_{NPQ} έτσι ώστε να μην υπάρξει καμιά αύξηση του Φ_{NO} αλλά αντίθετα σημαντική μείωση. Δηλαδή στην μεταχείριση με Pq των φύλλων του *Arabidopsis* υπήρξε η ενεργοποίηση ενός φωτοπροστατευτικού μηχανισμού με σημαντική αύξηση της μη φωτοχημικής απόσβεσης (NPQ) για την αποφυγή δημιουργίας ROS (Hideg et al 2008, Schreiber and Klughammer 2008). Ωστόσο, 1 ώρα μετά την επίδραση του Pq οι φωτοπροστατευτικοί μηχανισμοί φαίνεται ότι δεν ήταν αρκετά επαρκείς για την προστασία τους από το οξειδωτικό στρες.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ahuja I, Ric C H de Vos, Bones M A, Hall D R (2010) Review: Plant molecular stress responses face climate change. *Trends in Plant Science* 15: 664-674.
- Al-Shehbaz IA, O’Kane Jr SL (2002) Taxonomy and phylogeny of *Arabidopsis* (Brassicaceae). *Arabidopsis Book*. American Society of Plant Biologists, doi: 10.1199/tab.0001, pp. 1-22.
- Αναστασάκης Δ (2011) Γονιδιωματικές και λειτουργικές μελέτες επί ανθρώπινων αποαδενυλασών. Μεταπτυχιακή διατριβή. Πανεπιστήμιο Πάτρας. Σελ. 1-86.
- Asada K (1999) The water–water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50: 601-639.
- Asada K, Badger M (1984) Photoreduction of $^{18}\text{O}_2$ and $^{18}\text{H}_2\text{O}_2$ with a concomitant evolution of $^{16}\text{O}_2$ in intact spinach chloroplasts. Evidence for scavenging of hydrogen peroxide by peroxidase. *Plant and Cell Physiology* 25: 1169-1179.
- Asada K, Takahashi M (1987) Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. In: *Photoinhibition*. Edited by Kyle DJ, Osmond CB, Arntzen CJ. Elsevier, Amsterdam, pp. 227-287.
- Barbagallo RP, Oxborough K, Pallett KE, Baker NR (2003) Rapid, noninvasive screening for perturbations of metabolism and plant growth using chlorophyll fluorescence imaging. *Plant Physiology* 132: 485-493.

- Bray EA, Bailey-Serres J, Weretilnyk E (2000) Response to abiotic stresses. In: Biochemistry and Molecular Biology of Plants. Edited by Buchanan B, Gruissen W, Jones R. American Society of Plant Biologists, pp. 1158-1203.
- Bro E, Meyer S, Genty B (1996) Heterogeneity of leaf CO₂ assimilation during photosynthetic induction. Plant, Cell and Environment 19: 1349-1358.
- Calatayud A, Roca D, Martínez PF (2006) Spatial-temporal variations in rose leaves under water stress conditions studied by chlorophyll fluorescence imaging. Plant Physiology and Biochemistry 44: 564-573.
- Daley PE, Raschke K, Ball J T, Berry JA (1989) Topography of photosynthetic activity of leaves obtained from video images of chlorophyll fluorescence. Plant Physiology 90: 1233-1238.
- Demmig-Adams B, Adams III WW (1992) Photoprotection and other responses of plants to high light stress. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 43: 599-626.
- Διαμαντοπούλου Ε (2012) Μελέτη με τη μέθοδο της απεικόνισης του φθορισμού της χλωροφύλλης μεταλλαγμάτων *aba2-3 Arabidopsis thaliana* σε συνθήκες στρες ξηρασίας . Διπλωματική . Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης. Σελ. 1-49.
- Dietz KJ, Schreiber U, Heber U (1985) The relationship between the redox state of QA and photosynthesis in leaves at various carbon-dioxide, oxygen and light regimes. Planta 166: 219-226.
- Douris N, Green CB (2008) Noc out the fat: a short review of the circadian deadenylase Nocturnin. Annals of Medicine 40: 622-626.

- Farrington JA, Ebert M, Land E, Fletcher K (1973) Bibyridylium quaternary salts and related compounds. V. Pulse radiolysis studies of the reaction of paraquat radical with oxygen implication for the mode of action of bipyridyl herbicides. *Biochimica et Biophysica Acta* 314: 372-381.
- Genty B, Briantais JM, Baker NR (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta* 990: 87-92.
- Genty B, Meyer S (1995) Quantitative mapping of leaf photosynthesis using chlorophyll fluorescence imaging. *Australian Journal of Plant Biology* 22: 277-284.
- Goldstrohm AC, Wickens M (2008) Multifunctional deadenylase complexes diversify mRNA control. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9: 337-344.
- Gould K S. (2003) Free Radicals, oxidative stress and antioxidants In: *Abiotic stresses*. *Encyclopedia of Applied Plant Science*, pp. 9-16.
- Harvey B, Fraser T (1980) Paraquat tolerant and susceptible perennial ryegrasses: effects of paraquat treatment on carbon dioxide uptake and ultrastructure of photosynthetic cells. *Plant Cell and Enviroment* 3: 107-117.
- Havaux M, Dall'Osto L, Bassi R (2007) Zeaxanthin has enhanced antioxidant capacity with respect to all other xanthophylls in *Arabidopsis* leaves and functions independent of binding to PSII antennae. *Plant Physiology* 145: 1506-1520.
- Hideg É, Kós P, Schreiber U (2008) Imaging of NPQ and ROS formation in tobacco leaves: Heat inactivation of the water-water cycle prevents down-

- regulation of PSII. *Plant and Cell Physiology* 49: 1879-1886.
- Jung H S, Niyogi K K (2008) Molecular analysis of photoprotection of photosynthesis. In: *Photoprotection, Photoinhibition, Gene Regulation and Environment*. Edited by Demmig-Adams B, Adams W W II, Mattoo AK. Springer Science and Business Media B V, pp. 127-143.
- Koornneef M (1990) Linkage map of *Arabidopsis thaliana* (2n = 10). In: *Genetic Maps*, Edited by O'Brien SJ. Fifth Edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 695-697.
- Kramer DM, Johnson G, Kiirats O, Edwards, GE (2004) New fluorescence parameters for the determination of QA redox state and excitation energy fluxes. *Photosynthesis Research* 79: 209-218.
- Krause GH, Weiss E (1991) Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 42: 313-349.
- Lichtenthaler HK (1998) The stress concept in plants: an introduction. *Annals of the New York Academy of Sciences* 851: 187-198.
- Malkin R, Niyogi K (2000) Photosynthesis In: *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Edited by Buchanan B, Gruissen W, Jones R. American Society of Plant Biologists, pp. 568-628.
- Mazzucoteli E, Mastrangelo AM, Crosatti C, Guerra D, Stanca AM, Cattivelli L (2008) Review: Abiotic stress response in plants: When post-transcriptional and post-translational regulations control transcription. *Plant Science* 174: 420-431.

- Meinke DW, Cherry JM, Dean C, Rounsley SD, Koornneef M (1998) *Arabidopsis thaliana*: A model plant for genome analysis. *Science* 282: 662-682.
- Meyerowitz EM (1989) *Arabidopsis*, a useful weed. *Cell* 56: 263-269.
- Milthorpe FL, Dale JE (1983) The Growth and functioning of leaves. In: Proceedings of a symposium held prior to the thirteenth International Botanical Congress at the University of Sydney, 18-20 August 1981, Cambridge University Press, Cambridge; New York: pp 271-272.
- Moskova I, Todorova D, Alexieva V, Ivanov S, Sergiev I (2009) Effect of exogenous hydrogen peroxide on enzymatic and nonenzymatic antioxidants in leaves of young pea plants treated with paraquat. *Plant Growth Regulation* 57: 193-202.
- Moustakas M, Sperdouli I, Kouna T, Antonopoulou CI, Therios I (2011) Exogenous proline induces soluble sugar accumulation and alleviates drought stress effects on photosystem II functioning of *Arabidopsis thaliana* leaves. *Plant Growth Regulation* 65: 315-325.
- Muller P, Xiao-Ping Li, Niyogi KK (2001) Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant* 125: 1558-1566.
- Neubauer C, Yamamoto H (1992) Mehler-peroxidase reaction mediates zeaxanthin formation and zeaxanthin-related fluorescence quenching in intact chloroplasts. *Plant Physiology* 99: 1354-1361.
- Omasa K, Takayama K (2003) Simultaneous measurement of stomatal conductance, non-photochemical quenching, and photochemical yield of

photosystem II in intact leaves by thermal and chlorophyll fluorescence imaging. *Plant and Cell Physiology* 44: 1290-1300.

Osmond CB, Daley PF, Badger MR, Lüttge U (1998) Chlorophyll fluorescence quenching during photosynthetic induction in leaves of *Abutilon striatum* Dicks. infected with *Abutilon mosaic* virus, observed with a field-portable imaging system. *Botanica Acta* 111: 390-397.

Osmond CB, Kramer D, Lüttge U (1999) Reversible, water stress-induced non-uniform chlorophyll fluorescence quenching in wilting leaves of *Potentilla reptans* may not be due to patchy stomatal responses. *Plant Biology* 1: 618-624.

Oxborough K, Baker NR, (1997) Resolving chlorophyll a fluorescence images of photosynthetic efficiency into photochemical and non-photochemical components—calculation of q_P and F_v'/F_m' without measuring F_o' . *Photosynthesis Research* 54: 135-142.

Posch S, Bennett LT (2009) Photosynthesis, photochemistry and antioxidative defence in response to two drought severities and with re-watering in *Allocasuarina luehmannii*. *Plant Biology* 11 (S1): 83-93.

Rabinowitch E, Govindjee (1969) *Photosynthesis*. John Wiley and Sons, Inc. Printed in USA.

Rennenberg H, Loreto F, Polle A, Brilli F, Fares S, Beniwal RS, Gessler A (2006) Physiological responses of forest trees to heat and drought. *Plant Biology* 8: 556-571.

- Ρουμπελάκη-Αγγελακη ΚΑ (2003) Φυσιολογία φυτών από το μόριο στο περιβάλλον. Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης.
- Schreiber U, Bilger W, Neubauer C (1994) Chlorophyll fluorescence as a non-intrusive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis. In: Ecophysiology of photosynthesis. Series ecological studies, vol 100. Edited by Schulze ED, Caldwell MM. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 49-70.
- Schreiber U, Hormann H, Asada K, Neubauer C (1995) O₂-dependent electron flow in spinach chloroplasts: properties and possible regulation of the Mehler-ascorbate peroxidase cycle. In Photosynthesis: From Light to Biosphere. Edited by Mathis P. Vol. II. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 813-818.
- Schreiber U, Klughammer C (2008) Non-photochemical fluorescence quenching and quantum yields of PS I and PS II: analysis of heat-induced limitations measured by Maxi-Imaging-PAM and Dual-PAM-100. PAM Application Notes 1: 15-18.
- Smirnoff N (1993) The role of active oxygen in the response of plants to water-deficit and desiccation. New Phytologist 125: 27-58.
- Σπερδούλη Η (2011) Φωτοσυνθετικές και μεταβολικές αποκρίσεις του *Arabidopsis thaliana* σε συνθήκες ξηρασίας . Διδακτορική διατριβή. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης. Σελ. 1-156.
- Sperdouli I, Moustakas M (2012) Spatio-temporal heterogeneity in *Arabidopsis thaliana* leaves under drought stress. Plant Biology 14: 118-128.

- Szigetti Z, Racz I, Lasztity D (2001) Paraquat resistance of weeds-the cause of *Conyza canadensis* (L.) Cronq. Zeitschrift für Naturforschung 56C: 319-328.
- Taiz L, Zeiger E (2010) Plant physiology, 5th edition. Sinauer Associates, Inc., Publishers Sunderland, Massachussetts, USA.
- Τσέκος Ι (2004) Φυσιολογία Φυτών . 2^η έκδοση . Εκδοτικός Οίκος Αδελφών Κυριακίδη ΑΕ.
- Τομασίδου Α (2010) AtNOC, μια νέα αποαδενυλάση που ρυθμίζεται από τον κιρκάδιο ρυθμό στο *Arabidopsis thaliana*. Διπλωματική εργασία. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας. Σελ 1-60.
- Tomlin CDS (2000) The Pesticide Manual, 12th ed. British Crop Protection Council, Farnham, UK.
- Triantaphylidès C, Krischke M, Hoeberichts FA, Ksas B, Gresser G, Havaux M, Van Breusegem F, Mueller MJ (2008) Singlet oxygen is the major reactive oxygen species involved in photooxidative damage to plants. Plant Physiology 148: 960-968.
- Tucker M, Parker R (2000) Mechanisms and control of mRNA decapping in *Saacharomyces cerevisiae*. Annual Review of Biochemistry 69: 571-595.
- Vinocur B, Altman A (2005) Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. Current Opinion in Biotechnology 16: 123-132.
- Walter A, Rascher U, Osmond B (2004) Transitions in photosynthetic parameters of midvein and interveinal regions of leaves and their importance during leaf growth and development. Plant Biology 6: 184-191.

Zuo Y, Deutscher MP (2001) Exoribonuclease superfamilies: structural analysis and phylogenetic distribution. *Nucleic Acids Research* 29: 1017-1026.